

## **AKTIVITAS ANTIFERTILITAS EKSTRAK DAUN PACING *COSTUS SPECIOSUS* (KOEN.) J.E. SMITH PADA SPERMA TIKUS WISTAR JANTAN**

**Urla Tri Wulanzani<sup>1</sup>, Umie Lestari<sup>2</sup>, Istamar Syamsuri<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Pascasarjana, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang 5, Malang

<sup>2</sup>Jurusan Biologi, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang 5, Malang

E-mail korespondensi: urla.wulan@gmail.com

**Abstrak:** Pacing secara empiris digunakan oleh masyarakat sebagai bahan kontrasepsi tradisional, contohnya di Pulau Wawonii Sulawesi Tenggara daun pacing digunakan untuk kontrasepsi dan perawatan pasca persalinan dengan cara direbus. Berdasarkan fakta tersebut, penelitian ini bertujuan sebagai dasar dari pembuktian secara ilmiah kemampuan daun pacing sebagai calon obat kontrasepsi khususnya pada individu jantan baik secara makroskopis maupun secara molekuler. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun pacing terhadap motilitas tikus jantan strain wistar dan uji aktivitas fosforilasi protein membran spermatozoa tikus. Ekstrak daun pacing diberikan dengan variasi dosis yakni 65 dan 32 mg/kgBB, sementara itu kelompok kontrol diberikan akuades. Semua sediaan uji diberikan secara oral setiap hari selama 14 hari. Data hasil dari perhitungan motilis sperma selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis, dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Hasil penelitian motilitas sperma menunjukkan pada dosis 65 dan 32 mg/kg BB, ekstrak daun Pacing mampu menurunkan motilitas spermatozoa sebesar 32-46% ( $P < 0,05$ ). Hasil penelitian pada tahap elektroforesis menunjukkan terbentuknya 6 pita (*band*) dengan berat molekul 88 kDa; 57 kDa, 47 kDa, 22 kDa, 9 kDa, 3 kDa. Perhitungan aktivitas fosforilasi protein membran spermatozoa secara manual pada protein dengan berat molekul 47 kDa kontrol sebesar  $5,8 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL.menit}$ ; pada dosis satu  $5,2 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL.menit}$ ; sedangkan pada dosis dua  $4,4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL.menit}$ . Perhitungan aktivitas fosforilasi protein membran spermatozoa dengan berat molekul 3 kDa pada kontrol sebesar  $5,3 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL.menit}$ ; pada dosis satu  $1,2 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL.menit}$ ; sedangkan pada dosis dua  $1,7 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL.menit}$ . Nilai aktivitas fosforilasi tersebut selanjutnya dapat digunakan sebagai penunjang penentuan kalitas sperma terutama untuk motilitas sperma secara molekuler.

**Kata Kunci:** ekstrak, daun pacing, motilitas sperma, uji fosforilasi

### **1. PENDAHULUAN**

Salah satu program yang dicanangkan oleh pemerintah untuk mengatasi masalah kepadatan penduduk yaitu keluarga berencana (KB). Hanya saja pelaksanaan program KB kurang memberikan hasil optimal. Salah satu faktor yang menyebabkan hal tersebut salah satunya yaitu kurang berpartisipasi laki-laki. Data dari Kementerian Kesehatan menunjukkan bahwa perempuan yang memakai KB sebanyak 93,66% sedangkan laki-laki sebesar 6,34%. Hal tersebut menunjukkan bahwa partisipasi laki-laki dalam menggunakan alat kontrasepsi masih sangat rendah (Kementerian Kesehatan, 2013). Rendahnya partisipasi laki-laki mendorong untuk dilakukannya penelitian-penelitian ke arah penemuan kontrasepsi laki-laki yang tidak memiliki efek samping yang berarti, mencegah terjadinya fertilisasi, aman, mempunyai kinerja cepat, tanpa efek samping, dan tidak mempengaruhi potensi seks dan libido. Salah satu hal yang sedang dikembangkan saat ini adalah penggunaan tanaman obat alami Indonesia sebagai alternatif antifertilitas pria (Depkes, 2006).

Beberapa tanaman di Indonesia telah diteliti dan dilaporkan. Hasilnya menunjukkan beberapa tanaman memiliki kemungkinan untuk dikembangkan sebagai bahan obat kontrasepsi diantaranya biji saga, meniran, teh hitam, biji klabet, gandarusa, daun sirih, dan pacing (Muslichah, 2013; Harlis, 2012; Delfina, 2014; Wiryawan, 2009; Prajogo, 2002; Mudayatiningsih, 2015, Sari, 2012). Salah satu tanaman yang merupakan kandidat bahan alami kontrasepsi laki-laki adalah tanaman pacing. Penelitian yang sudah dilakukan membuktikan bahwa 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) (Sari, 2012). Komponen aktif yang berperang dalam kontrasepsi pada tanaman pacing adalah deosgenin (Lubis, 1977). Jumlah maksimum diosgenin dilaporkan dalam batang sebesar 0,65%, di daun sebesar 0,37% dan di bagian sebesar bunga 1,21% (Srivastava dkk., 2011).

Berdasarkan kandungan bahan kimia yang sudah dipaparkan di atas dan penelitian-penelitian sebelumnya maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun pacing terhadap motilitas. Sedangkan motilitas sperma sendiri juga berkaitan dengan kemampuan sperma dalam membuahi sel telur. Agar sperma dapat melakukan motilitas atau melakukan pergerakan progresif saat akan membuahi sel telur. Sperma

membutuhkan energi. Energi didapatkan dari aktivitas fosforilasi (Zukmadini, 2015). Berdasarkan hal tersebut aktivitas fosforilasi yang dilakukan oleh protein membran spermatozoa sangat erat kaitannya dengan motilitas sperma. Sehingga penelitian ini bermaksud untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun pacing terhadap motilitas dan uji aktivitas fosforilasi.

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen, menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Sampel terdiri dari 48 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dengan berat badan 150 g yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol, yang hanya diberi pakan standar dan akuades steril 1ml/100 g BB dan 2 kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun pacing dengan dosis berbeda, yaitu 65 dan 32 mg/kg BB. Perlakuan diberikan secara oral, sebanyak 1,0 ml/hari selama 14 hari. Perlakuan dilakukan dalam dua tahap, 24 tikus pertama diberi perlakuan terlebih dahulu selanjutnya dilanjutkan dengan 24 tikus berikutnya. Perlakuan dilakukan delapan kali ulangan. Sehingga 24 tikus untuk melihat motilitas untuk setiap konsentrasi perlakuan, begitu juga untuk menguji aktivitas fosforilasi.

Pemeliharaan dan perlakuan dilakukan di kandang untuk hewan uji coba yang berada di *Green House* Universitas Negeri Malang. Sedangkan ekstrak daun pacing diperoleh dari Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang. Tikus sebagai hewan uji diperoleh dari peternakan tikus yang bernama *Murine Farmer* milik Bapak Ismarjoto yang merupakan peternak tikus putih yang sudah memiliki sertifikat di daerah Singosari, Malang. Perhitungan motilitas dilakukan di Laboratorium Mikroskopi Universitas Negeri Malang. Sedangkan untuk pengujian aktivitas fosforilasi dengan tahapan kerja isolasi protein, elektroforesis, elektroelusi, dan uji aktivitas fosforilasi dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Negeri Malang.

Pada hari ke 15 untuk setiap tahap perlakuan dikorbankan dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah. Spermatozoa diambil dengan cara memotong vasdeferens dan epididimis untuk pengamatan motilitas menggunakan mikroskop. Perhitungan persentase motilitas spermatozoa menggunakan kategori menurut 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.

Sedangkan untuk menguji aktivitas fosforilasi dilakukan dengan cara mengambil sperma dari vasdeferens maupun epididimis dengan cara diplurut. Tahapan penelitian uji fosforilasi terdiri atas: (1) isolasi protein untuk memperoleh protein spermatozoa tikus, (2) penentuan kadar protein, (3) Elektroforesis SDS-PAGE untuk memisahkan protein membran spermatozoa berdasarkan berat molekulnya, (4) Elektroelusi untuk purifikasi protein membran spermatozoa yang memiliki berat molekul 47 kDa dan 3 kDa hasil dari perhitungan berat molekul hasil Elektroforesis SDS-PAGE, dan (5) uji aktivitas fosforilasi dengan mereaksikan protein membran dengan ATP dan protein substrat berupa protein histon untuk mengetahui banyaknya ATP yang mengalami fosforilasi, menggunakan rumus:

$$\text{Unit aktivitas} = \frac{\text{ATP awal} - \text{ATP sisa}}{\text{Mr ATP}} \times \frac{V}{p \cdot q} \times fp$$

Keterangan:

V= volume total percobaan pada tiap tabung (mL)

q= volume enzim (mL)

fp= faktor pengencer enzim: 4

Mr ATP= 551,2 µg/µmol

Hasil dari perhitungan motilitas sperma dianalisis secara statistik menggunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis, dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### a. Hasil dan Pembahasan Motilitas

Hasil motilitas spermatozoa akibat pemberian ekstrak daun pacing disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Motilitas Spermatozoa Mencit Jantan Akibat Pemberian Ekstrak Daun Pacing Selama 14 Hari

No	Konsentrasi	Motilitas Spermatozoa (Rata-Rata)
1	Aquadest	67 %
2	Ekstrak Daun Pacing 32 mg/kg BB	48 %
3	Ekstrak Daun Pacing 65 mg/kg BB	36 %

Pemberian ekstrak daun pacing 32 mg/kg dan 65 mg/kg BB dapat menurunkan persentase motilitas sebesar 32-46 %. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sari (2012), yang melaporkan bahwa infusa

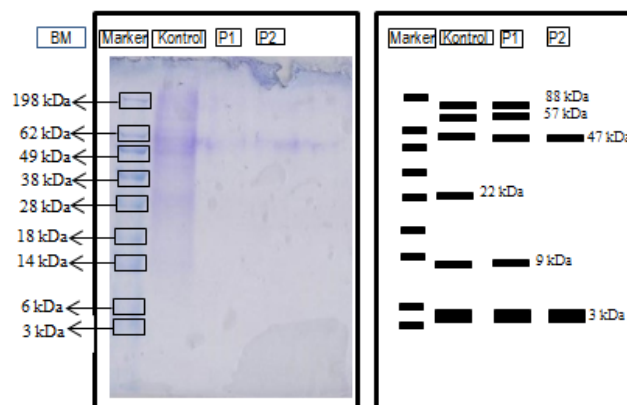
daun pacing mampu menurunkan motilitas spermatozoa sebesar 36-39%. Persentase motilitas spermatozoa dibawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan sering berhubungan dengan infertilitas. (Toelihere, 1993). Sehingga dapat dikatakan bahwa motilitas yang dihasilkan tersebut cenderung rendah. Ekstrak daun pacing dapat menurunkan motilitas sperma. Terganggunya motilitas spermatozoa diduga disebabkan oleh kandungan senyawa tanin dalam ekstrak daun (Wahyuni, Tanpa Tahun). Tanin mempunyai aktivitas biologis antara lain dapat menggumpalkan protein (Hangerman, 2002).

Diduga protein dinein mengalami kerusakan oleh adanya senyawa tanin tersebut sehingga mekanisme pembebasan energi untuk motilitas spermatozoa terganggu. Tanin dapat meingkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Spermatozoa mamalia sangat sensitif terhadap radikal bebas (ROS), yang memediasi peroksidasi lipid pada membran sel spermatozoa yang kaya dengan asam lemak. Sehingga peningkatan produksi ROS tersebut pada membran sel sperma dapat menyebabkan penurunan motilitas (Lenzi, et al, 1993). Selain kerusakan pada membran sel sperma, kerusakan langsung mitokondria sperma oleh ROS juga menyebabkan penurunan ketersediaan energi dan penurunan motilitas sperma (Tremallen, 2008).

#### b. Hasil dan Pembahasan Uji Aktivitas Fosforilasi

Tahapan uji aktivitas fosforilasi dimulai dari isolasi protein membran spermatozoa. Hasil isolasi protein membran spermatozoa berupa crude protein untuk masing-masing dosis perlakuan kemudian dihitung kadar proteinnya menggunakan nanodrop. Perhitungan kadar protein menunjukkan bahwa kadar protein kontrol (aquadst) sebesar 0.963 mg/mL. Perlakuan pertama (ekstrak daun pacing 65 mg/kg BB) memiliki konsentrasi sebesar konsentrasi 0.379 mg/mL. Perlakuan kedua (ekstrak daun pacing 32 mg/kg BB) memiliki konsentrasi sebesar konsentrasi 0.809 mg/mL.

Selanjutnya yaitu tahapan elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphonate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) crude protein membran spermatozoa hasil isolasi protein untuk pengujian profil protein membran spermatozoa tikus. Hasil elektroforesis SDS-PAGE dan zimogramnya ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Gambar Profil Protein Membran Spermatozoa Tikus (kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2), (a) Gambar Hasil Elektroforesis SDS-PAGE (b) Zimogram Hasil Elektroforesis

Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan kondisi protein yang sudah terdisosiasi dapat dipakai untuk memperkirakan berat molekul suatu protein. Hasil elektroforesis SDS-PAGE juga menunjukkan adanya pita protein yang muncul. Berat molekul protein yang muncul dari sampel dapat diketahui dengan menggunakan acuan berat molekul protein standar marker. Selanjutnya dilakukan analisis regresi linear dari data protein standar marker dan diperoleh. Hasil perhitungan rata-rata berat molekul tersebut disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Perhitungan Berat Molekul Rata-Rata Protein Membran Spermatozoa Tikus

No	a (cm)	b (cm)	Rf (x)	Y	BM (kDa)
1	0.9	5	0.18	1.94562	88
2	1.3	5	0.26	1.76234	58
3	1.5	5	0.3	1.6707	47
4	2.2	5	0.44	1.34996	22
5	3	5	0.6	0.9834	9
6	4.1	5	0.82	0.47938	3

Keterangan:

- a : Jarak pita protein pada gel poliakrilamid hasil elektroforesis (cm)  
 b : Jarak pewarna (RSB) pada gel poliakrilamid hasil elektroforesis (cm)  
 Rf (x) : Hasil bagi antara nilai a dan b  
 y : Hasil substitusi nilai Rf pada nilai x persamaan fungsi  $y = -1,807x + 2,403$   
 BM : Berat molekul (kDa) hasil konversi antilog nilai y

Pada Tabel 1 dan Gambar 1 tersebut diperoleh berat molekul yang sama antara kontrol, perlakuan 1, dan perlakuan 2. Hanya saja pada perlakuan 1 ada protein dengan berat molekul 22 kDa yang menghilang apabila dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan pada perlakuan yang kedua banyak berat molekul yang menghilang yaitu 88, 58, 22, dan 9 kDa apabila dibandingkan dengan kontrol.

Berat molekul protein yang digunakan untuk analisis selanjutnya adalah protein dengan berat molekul yang telah diketahui memiliki aktivitas fosforilasi yaitu protein dengan berat molekul 47 kDa. Sesuai dengan hasil penelitian dari Codelia (2005). Berat molekul 3 kDa diuji juga aktivitas fosforilasinya karena pada masing-masing perlakuan berat molekul tersebut konsisten muncul, sehingga diperlukan perhitungan untuk mengetahui aktivitas fosforilasi yang terjadi. Protein dengan berat molekul spesifik 47 kDa dan 3 kDa diperoleh melalui elektroelusi. Hasil kadar protein hasil elusi untuk 47 kDa kontrol 0,046 mg/mL, 47 kDa perlakuan 1 yaitu 0,064 mg/mL, 47 kDa perlakuan 2 yaitu 0,054 mg/mL, 3 kDa kontrol 0,022 kDa, 3 kDa perlakuan 1 yaitu 0,057 mg/mL, 3 kDa perlakuan 2 yaitu 0,063 kDa.

Berat molekul spesifik yang hasil elektroelusi selanjutnya diuji aktivitas fosforilasinya. Aktivitas fosforilasi protein membran spermatozoa dihitung berdasarkan konsentrasi ATP yang bereaksi, kemudian dimasukkan ke dalam rumus unit aktivitas fosforilasi untuk mengetahui aktivitas fosforilasi protein membran spermatozoa tiap menit. Konsentrasi ATP dapat diketahui dengan menggunakan acuan konsentrasi larutan standar ATP (Zukmadini, 2015). Hasil perhitungan aktivitas fosforilasi pada berat molekul 47 kDa dan 3 kDa pada kontrol, perlakuan 1, dan perlakuan 2 disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Perhitungan Aktivitas Fosforilasi pada Berat Molekul 47 kDa dan 3 kDa pada Kontrol, Perlakuan 1, dan Perlakuan 2

No	BM (kDa)	ATP <sub>awal</sub> (ppm)	ATP <sub>sisa</sub> (ppm)	ATP <sub>bereaksi</sub> (ppm)	Unit Aktivitas ( $\mu\text{mol/mL.menit}$ )
1	47 kontrol	173,5	23,5	150	$5,8 \times 10^{-1}$
2	47 P1	173,5	36,5	107	$5,2 \times 10^{-1}$
3	47 P2	173,5	61,5	111,5	$4,4 \times 10^{-1}$
4	3 Kontrol	173,5	33	140,5	$5,3 \times 10^{-1}$
5	3 P1	173,5	141	32,5	$1,2 \times 10^{-1}$
6	3 P2	173,5	128,5	45	$1,7 \times 10^{-1}$

Perbedaan aktivitas fosforilasi pada protein membran spermatozoa tikus yang sudah diberikan ekstrak daun pacing dengan berat molekul yang berbeda menunjukkan bahwa jumlah gugus fosfat yang difosforilasi atau dipindahkan dari ATP ke suatu protein substrat (histon) lebih sedikit pada protein dengan berat molekul 3 kDa dibandingkan pada protein dengan berat molekul 47 kDa.

Aktivitas fosforilasi pada protein membran spermatozoa tikus dengan berat molekul 3 kDa dan 47 kDa sejalan dengan hasil penelitian Codelia (2005) yang menunjukkan adanya aktivitas fosforilasi selama proses kapasitas pada beberapa protein membran spermatozoa tikus diantaranya dengan berat molekul 47 dan 22 kDa. Protein membran sperma tikus dengan berat molekul 3 kDa memang belum terdapat penelitian yang membahas aktifitasnya. Hanya saja setelah dilakukan uji aktivitas fosforilasi juga menunjukkan hasil unit aktivitasnya. Sehingga disini membuktikan bahwa aktifitas fosforilasi juga terjadi pada protein dengan berat molekul 3 kDa. Aktivitas seluler yang dilakukan oleh protein sangat berhubungan dengan kemampuan protein untuk melakukan

aktivitas fosforilasi. Aktivitas fosforilasi merupakan penambahan gugus fosfat ke suatu substrat (Sherwood, 2014). Aktivitas fosforilasi salah satunya terjadi pada membran spermatozoa. Aktivitas fosforilasi ini bertujuan untuk memperoleh energi dengan cara mentransfer gugus fosfat ke suatu protein. Aktivitas fosforilasi pada membran spermatozoa ini sangat penting dalam motilitas, reaksi akrosom, dan pembuatan zona pelusida pada saat fertilisasi, termasuk kapasitasi (Nath and Majumder., 1999).

Kapasitasi sperma merupakan proses dimana sperma saat ejakulasi mengalami perubahan tertentu dibagian akrosom untuk memungkinkan sperma ini untuk menembus cumulus dan zona pelusida untuk mencapai sitoplasma oosit (Visconti, 2010). Kapasitasi juga meliputi aktivasi gerakan kuat dan asimetris dari flagella dan ini terjadi segera setelah sperma meninggalkan epididimis. Kapasitasi juga mencakup perubahan pola pergerakan atau motilitas (*hyperactivation*). Kapasitasi terjadi karena adanya fosforilasi yang diinduksi oleh jalur siklik adenosin monophosphat (cAMP) atau protein kinase A (PKA). Sehingga fosforilasi protein tirosin merupakan proses yang penting dalam kapasitasi. Sedangkan kapasitasi sangat berpengaruh pada motilitas sperma (Naz & Preeti, 2004).

### c. Hubungan Motilitas dan Uji Fosforilasi

Motilitas sperma berkaitan dengan kemampuan sperma dalam membuahi sel telur. Agar sperma dapat melakukan motilitas atau melakukan pergerakan progresif saat akan membuahi sel telur. Sperma membutuhkan energi. Energi tersebut diperoleh dari hasil hidrolisis ATP menjadi ADP dan Pi (Zukmadini, 2015).

Persentase motilitas sperma pada kontrol cenderung lebih besar daripada kelompok perlakuan. Apabila dilihat dari uji fosforilasi kontrol memang memiliki aktivitas fosforilasi yang besar, dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Hal ini terlihat dari lebih banyak ATP yang terfosforilasi oleh protein membran sperma pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Tabel perbandingan motilitas dan hasil uji fosforilasi disajikan pada Tabel 4.

Motilitas salah satunya dipengaruhi oleh aktifitas fosforilasi. Aktivitas fosforilasi inilah yang berperan dalam menyediakan energi bagi sperma pada saat kapasitasi dan reaksi akrosom (Naz & Preeti, 2004).

Tabel 4. Perbandingan Motilitas dan Hasil Uji Aktivitas Fosforilasi

No	Perlakuan	Motilitas Rata-Rata	Rata-Rata Unit Aktivitas ( $\mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ )
1	Kontrol	67 %	$5,55 \times 10^{-1}$
2	P1	48 %	$3,20 \times 10^{-1}$
3	P2	36 %	$2,95 \times 10^{-1}$

## 4. SIMPULAN

Ekstrak daun pacing pada dosis 65 dan 32 mg/kg BB mampu menurunkan jumlah spermatozoa sebesar 32-46 % ( $P < 0,05$ ). Hasil elektroforesis menunjukkan terbentuk 6 pita (band) dengan berat molekul 88 kDa; 57 kDa, 47 kDa, 22 kDa, 9 kDa, 3 kDa. Perhitungan aktivitas fosforilasi protein membran spermatozoa 47 kDa pada kontrol sebesar  $5,8 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ ; pada dosis satu  $5,2 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ ; pada dosis dua  $4,4 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ . Perhitungan aktivitas fosforilasi protein membran spermatozoa 3 kDa pada kontrol sebesar  $5,3 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ ; pada dosis satu  $1,2 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ ; pada dosis dua  $1,7 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{mL}.\text{menit}$ . Nilai aktivitas fosforilasi dapat digunakan sebagai penunjang penentuan kualitas sperma terutama untuk motilitas sperma.

## 5. DAFTAR PUSTAKA

- Delfita, Rina. 2014. Potensi Antifertilitas Ekstrak Teh Hitam Pada Mencit (*Mus musculus L.*) Jantan. *Jurnal Sainstek. Vol. VI No. 2*, 181-188.
- Depkes. (2005). Partisipasi Pria dalam Program KB masih Rendah, Diakses dari: <http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=997>.
- Hangerman, AE. 2002. *Tannin Chemistry*. Diakses dari <http://www.user.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>.
- Harlis, Wa Ode. 2012. Uji Potensi Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri, L.*) Terhadap Spermatogenesis Tikus (*Rattus norvegicus, L.*). *WD Harlis //Paradigma. Vol. 16 No.1*, 39-46.
- Kemntrian kesehatan. 2013. Situasi dan Analisis Keluarga Berencana. Diakses dari <http://www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/infodatin-harganas.pdf>
- Lenzi, A., Cualosso, F., Gandini, L., Lombardo F., and Dondero, F. 1993. Placebo Controlled, Double-blind, Cross Over Trial of Glutathione Therapy in Male Infertility, *Human Repro Jour. Vol.9*, 2044-2050.
- Lubis, I., S.H. Aminah, L., dan S. Sastrapradja. 1980. *Costus*, Sumber Nabati Baru Untuk Bahan Kontrasepsi. *Risalah Simposium Penelitian Obat II*. Departemen Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB dan Fotum Penelitian Jamu Gugus Bogor: Bogor.



- Mudayatiningsih, S., Endang S. D. Hastuti S., Isnaeni, D. T. N. 2015. Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle L*) Dan Kualitas Spermatozoa Pada Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Informasi Kesehatan Indonesia (Jiki)*. Volume 1 No. 2, 127-136.
- Muslichah, S., Wiratmo, Diana H., Fifteen A. F. 2014. Potensi Biji Saga (*Abrus Precatorius*) Sebagai Kontrasepsi Pria. *Pharmacy*. Vol.11 No. 02.
- Nath D. and G. C. Majumder. Maturation-Dependent Modification Of The Protein Phosphorylation Profile Of Isolated Goat Sperm Plasma Membrane. *Journal of Reproduction and Fertility*.
- Naz, R.K. and Preeti, B.R. 2004. Review: Role of Tyrosine Phosphorylation In Sperm Capacitation /Acrosome Eraction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Vol 2 No. 75, 1-12.
- Prajogo, Bambang EW. 2002. Aktivitas Antifertilitas Flavonoid Daun Justicia Gendarussa Brm.F. Penelitian Eksperimental Pencegahan Penetrasi Spermatozoa Mencit Dalam Proses Fertilisasi *In Vitro*. Disertasi. Universitas Airlangga.
- Rahayu, M., Sunarti, S., Sulistiarini, D., & Prawiroatmodjo, S., 2006, Pemanfaatan Tumbuhan Obat secara Tradisional oleh Masyarakat Lokal di Pulau Wawonii, Sulawesi Tenggara, *Biodiversitas*. Vol 7 No. 3, 245- 250.
- Sari, I. P., Siti R., Dicky M. R. 2012. Infusa Daun Pacing *Costus Speciosus* (Koen.) J.E. Smith Sebagai Penghambat Jumlah Dan Kualitas Spermatozoa Pada Mencit Jantan Balb/C. *Trad. Med. J.Vol. 18 No. 1*, 59-66
- Sherwood, Lauralee. 2012. *Fundamentals of Human Physiology Fourth Edition*. USA: Cengage Learning.
- Srivastava, S., Singh, P., Mishra, G., Jha, K.K. & Khosa, R.L., 2011. *Costus speciosus* (Keukand): A review. *Der Pharmacia Sinica*. Vol 2 No. 1, 118-128.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Angkasa: Bandung
- Tremallen, K. 2008. Oxidative Stress and Male Infertility a Clinical Perspective. *Human Reprod*. Vol 14, 243-258.
- Visconti, P. E, Dario K., Jose' Luis de la V. B., Juan J. A. and Alberto D.. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm Capacitation. *Asian Journal of Andrology*. Vol 13, 395-405
- Wahyuningsih, E. Tanpa Tahun. *Costus speciosus (Koenig) J.E Smith*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat UNAS/ P3TO UNAS. Diakses dari [ftp://202.125.94.81/linux/docs/v12/artikel/ttg\\_tanaman\\_obat/unas/Pacing.pdf](ftp://202.125.94.81/linux/docs/v12/artikel/ttg_tanaman_obat/unas/Pacing.pdf) .
- Wiryawan, I. G. N. S. dan Ida A. I. W. 2009. Ekstrak Biji Klabet Menurunkan Jumlah Sel Spermatozoa pada Kelinci. *Jurnal Veteriner*. Vol. 10 No. 2, 71-76
- Zukmadini, A. Y. Teknik Analisis Biologi Molekuler. Modul Hasil Pengembangan Thesis. Universitas Negeri Malang