

GONADOSOMATIC INDEX TIKUS JANTAN (*Rattus norvegicus*) SETELAH PAPARAN EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*) SEBAGAI SENYAWA ANTIFERTILITAS

Alam Rivky Saputra^{*1}, Agung Janika Sitasiwi², Tyas Rini Saraswati³
Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
**Corresponding author:* saputraalam061@gmail.com

Abstract

*Neem leaves is one part of the neem tree (*Azadirachta indica*) containing antifertility compounds which can suppress the rate of male rat reproduction. The purpose of this study is to examine Gonadosomatic Index after exposure of neem leaves ethanol extract as antifertility compounds. This study is an experimental study with a Completely Randomized Design (CRD), using 12 male rats divided into 4 treatment groups and 3 replications. P0 is a control with aquades treatment, P1, P2, and P3 (neem leaves ethanol extract with each dose of 60, 80, and 100 mg/kgBW/day). The treatment was administered orally with a volume of 1 ml for 14 days. The main parameters are testicular weight, body weight and GSI. Body weights were measured every 7 days. Surgery was done after the treatment ends for measuring testicular weight and testicular isolation continued by measuring GSI values. GSI value is determined from body weight and testicular weight. The results were analysed using ANOVA at 95% confidence level. The analysis results showed that there were no significant differences ($P > 0.05$) in the body weight and testicular weight parameters, but there were a significant different ($P < 0.05$) in GSI values. The test results of GSI values show the different decrements in the treatment of P2. Based on the results of the test, it could be concluded that the exposure of neem leaves ethanol extract at doses of 60, 80, 100 mg/kgBW/day for 14 days of exposure time can cause antifertility effect in male rats.*

Keywords: *Neem leaves, GSI, rat reproduction, body weight, testicular weight.*

PENDAHULUAN

Tikus merupakan hama utama tanaman padi di Indonesia yang dapat menyebabkan kerusakan pada tanaman padi dari mulai di persemaian sampai panen, bahkan sampai penyimpanan. Kerusakan akibat tikus sawah di negara-negara Asia mencapai 10-15% setiap tahun (Singleton, 2003), sedangkan di Indonesia luas serangan tikus sawah setiap tahun rata-rata mencapai lebih dari 100.000 ha.

Berbagai alternatif pengendalian telah dilakukan dalam usaha mengatasi masalah tikus, baik secara kultur teknis, fisik mekanik, maupun secara kimia.

Dinas Pertanian Perkebunan dan Kehutanan telah melakukan beberapa pendekatan penanggulangan hama tikus yaitu dengan cara gropyokan, emposan dan pemberian umpan beracun rodentisida. Metode yang digunakan tersebut di atas ternyata tingkat keberhasilannya masih rendah (Setiabudi *et al.*, 2015).

Chateau & Boehm (1995) menyatakan bahwa perkembangan populasi hama tikus sawah yang pesat salah satunya sangat dipengaruhi oleh tingginya laju reproduksi tikus. Tikus memiliki laju reproduksi yang sangat tinggi dengan jumlah anak yang relatif

banyak perkelahiran selama musim kawin sepanjang tahun. Laju reproduksi tikus yang tinggi perlu diseimbangkan dengan cara menekan laju reproduksi melalui pengendalian fertilitas (fertility control). Pengendalian fertilitas salah satu caranya yaitu dengan menggunakan tanaman Mimba. Tanaman Mimba merupakan tanaman yang bernilai ekonomis dan kaya akan manfaat. Daun hingga akarnya dapat dimanfaatkan dalam kehidupan manusia. Bagian-bagian Mimba banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang, tetapi manfaat daun Mimba belum banyak diketahui oleh banyak masyarakat (Biswas *et al.*, 2002).

Mimba mengandung bahan aktif azadirachtin, meliantriol, salanin, nimbin, nimbidin dan bahan lainnya (Burrow *et al.*, 2001). Azadirachtin mengandung sekitar 17 komponen dan terdapat di semua bagian tanaman, terutama biji (Kardinan, 2000). Senyawa azadirachtin memiliki aksi sebagai repelan (penolak), racun sistemik, racun kontak, zat anti fertilitas dan penghambat pertumbuhan (Nurtiati, 2001).

Seiring penelitian tentang pemanfaatan tanaman mimba, terutama pada biji dan daunnya dapat digunakan sebagai antifertilitas baik pada hewan jantan maupun betina (Priya *et al.*, 2012). Roop *et al.*, (2005) menyatakan bahwa uji Mimba ini dapat menghambat

folikulogenesis pada tikus albino. Kandungan di dalam ekstrak daun Mimba memiliki efek antifertilitas sementara (*reversible*), anti implantasi dan dapat mengakibatkan abortus (Morovati *et al.* 2008). Pemanfaatan daun mimba pun telah banyak dibuktikan di dalam masyarakat sebagai antifertilitas pada pria tanpa menurunkan libido (Suryawanshi, 2011).

Menurut penelitian Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium (BPKI), di dalam daun mimba mengandung flavonoid 1,56% dan senyawa bioaktif triterpenoid 0,39% yang berpengaruh terhadap infertilitas hewan jantan dan betina. Alkaloid dapat menekan sekresi hormon reproduksi yaitu testoteron sehingga proses spermatogenesis terganggu. Flavonoid mampu menghambat enzim aromatase yaitu enzim yang mengkatalis konversi androgen menjadi estrogen yang meningkatkan hormon testoteron.

Hasil penelitian Gufron (2005) membuktikan bahwa pemberian ekstrak daun Mimba dengan dosis 200 mg/kgBB pada tikus putih dapat menurunkan kuantitas dan kualitas spermatozoa. Hasil penelitian Auta & Hasan (2016) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun Mimba berpengaruh terhadap bobot testis, LH (Leutinizing Hormone), FSH (Follicle Stimulating Hormones) dan

testosteron. Hal ini diduga berpengaruh pada bobot testis dan Indeks Kematangan Gonad (Gonadosomatic Index). Menurut Rustidja (2001), Indeks Kematangan Gonad (Gonadosomatic Index) adalah suatu metode kuantitatif untuk mengetahui tingkat kematangan yang terjadi pada gonad. Indeks Kematangan Gonad yaitu suatu hasil perbandingan bobot testis dengan bobot tubuh kemudian dikalikan 100%.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini berlangsung selama 2 bulan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang. Rancangan penelitian yang digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 3 ulangan.

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah seperangkat kandang pemeliharaan tikus dan perlengkapannya, neraca analitik, pinset, tabung erlenmeyer, gelas ukur 100 ml, kompor listik, jarum suntik 3ml, label kecil dan besar, tempat pakan dan minum, sekam padi, sarung tangan dan *set alat* bedah.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah hewan uji berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*). Bahan uji

berupa kloroform, daun mimba (*Azadirachta indica*) dan NaCl fisiologis.

Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 2 bulan, dengan rata-rata bobot badan 100-200 g. Hewan uji diaklimasi pada kondisi laboratorium selama 2 minggu agar dapat beradaptasi dengan dengan kondisi lingkungan yang baru. Selama proses aklimasi tikus diberi pakan standar (HI-PROVITE Medicated 594), dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*.

Ekstraksi Daun Mimba

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dengan kriteria warna daun hijau muda serta daun diambil dari pucuk daun hingga 2-3 tangkai di bawah pucuk. Sampel daun mimba yang telah dikumpulkan dibersihkan dari kotoran, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 45° - 50 °C. Daun yang sudah kering kemudian dibuat menjadi serbuk dengan diblender. Ekstraksi daun Mimba menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi. Kristanti (2008) menyatakan bahwa penggunaan ethanol sebagai pelarut karena alkohol merupakan pelarut universal yang baik untuk mengekstraksi semua golongan senyawa metabolit sekunder.

Persiapan Bahan Uji

Dosis ekstrak daun mimba yang diberikan adalah 60 mg/kgBB/hari, 80 mg/kgBB/hari, dan 100 mg/kgBB/hari yang dilarutkan dalam aquades sebesar 1 ml. Larutan diberikan secara oral dengan volume 1 ml per hewan uji yang masing-masing mengandung ekstrak daun mimba 12 mg; 16 mg dan 20 mg.

Pemberian Perlakuan dan Pengamatan

Pemberian perlakuan oral dengan volume 1 ml per hewan uji, pada sore hari (pukul 16.00 – 17.00), selama 14 hari berturut-turut. Bobot badan tikus diukur setiap 7 hari sekali. Konsumsi pakan diukur setiap 3 hari sekali. Konsumsi minum diukur setiap hari. Hari ke-14 dilakukan pembedahan pada tikus uji. Pembedahan ini dilakukan untuk mengetahui bobot testis kiri, dan testis kanan. Tikus yang telah dibedah, kemudian diambil testis kiri dan kanannya. Organ testis yang telah diambil kemudian diisolasi lalu ditimbang menggunakan neraca dengan ketelitian 0,01 gram.

Pengamatan dilakukan dengan pengukuran GSI. GSI ditentukan dengan menggunakan rumus seperti yang dijelaskan oleh Auta & Hassan (2016) sebagai berikut:

$$GSI = \frac{BT}{BB} \times 100\%$$

Keterangan :

GSI : Gonadosomatic Index

BT : Bobot Testis

BB : Bobot Badan

Analisis Data

Data bobot badan dan bobot testis tikus dianalisis dengan ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%, dan taraf signifikansi 5%. Hasil analisis yang menunjukkan perbedaan bermakna adalah pada parameter GSI. Hasil analisis ANOVA tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji DMRT dengan taraf kepercayaan 95% dan taraf signifikansi 5%. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*)for Windows versi 23.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian dari pemberian ekstrak daun Mimba terhadap bobot badan, bobot testis, dan GSI (Gonadosomatic Index) disajikan pada **Tabel 1**. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun Mimba terhadap bobot badan tikus jantan yang ditunjukkan pada histogram (Gambar 1) tidak memberikan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Hasil data tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun mimba tidak mempengaruhi bobot badan tikus jantan.

Bobot badan lebih banyak dipengaruhi oleh konsumsi pakan. Pemberian ekstrak daun mimba diduga

Tabel 1. Rerata bobot badan, bobot testis, dan GSI tikus jantan setelah pemberian ekstrak daun Mimba selama 14 hari

Parameter	Perlakuan			
	P0 $\bar{x} \pm SD$	PI $\bar{x} \pm SD$	P2 $\bar{x} \pm SD$	P3 $\bar{x} \pm SD$
Bobot Badan (g)	193,33 ^a ± 25,16	200,00 ^a ± 26,45	196,67 ^a ± 32,14	193,33 ^a ± 15,27
Bobot Testis (g)	2,23 ^a ± 0,34	2,41 ^a ± 0,37	2,05 ^a ± 0,34	2,27 ^a ± 0,23
GSI (%)	1,14 ^b ± 0,04	1,19 ^b ± 0,03	1,04 ^a ± 0,04	1,17 ^b ± 0,07

Keterangan: Angka yang diikuti oleh superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata ($p > 0,05$). P0 : Kontrol dengan pelarut bahan uji akuades 1 ml/ekor/hari, P1 : Perlakuan dengan bahan uji konsentrasi 60 mg/kgBB/hari, P2 : Perlakuan dengan bahan uji konsentrasi 80 mg/kgBB/hari, P3 : Perlakuan dengan bahan uji konsentrasi 100 mg/kgBB/hari.

tidak mempengaruhi konsumsi pakan hewan uji. Komposisi pakan tikus yang diberikan mengandung kadar air 13%, protein 17,5 – 19,5%, lemak 3%, serat 8%, abu 7%, kalsium 0,9%, dan fosfor 0,6. Menurut Upa *et al.*, (2017) pakan ideal untuk tikus yang sedang tumbuh, minimal harus memenuhi kebutuhan zat makanan antara lain protein 12%, lemak 5%, kalsium 0,9%, fosfor 0,6% dan serat kasar kira-kira 5%. Hal ini menunjukkan bahwa konsumsi pakan harian yang diberikan memiliki komposisi yang seimbang sehingga tidak mempengaruhi bobot badan tikus.

Penelitian Susetyarini (2013) menunjukkan bahwa bobot badan setelah pemberian senyawa antifertilitas pada tikus jantan yaitu berkisar 190 – 240 g. Bobot badan tikus jantan pada penelitian ini yaitu berkisar 193,33 – 200 g. Hal tersebut menunjukkan bahwa bobot badan masih dalam kisaran normal.

Hasil ANOVA pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Mimba terhadap

bobot testis tikus yang ditunjukkan pada histogram (Gambar 2) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun Mimba tidak mempengaruhi bobot testis tikus. Hal tersebut berbeda dengan penelitian Apolonia (2017) yaitu pemberian ekstrak etanol daun Mimba pada dosis 100 mg/kgBB dapat menyebabkan penurunan bobot testis. Faktor utama yang mempengaruhi bobot testis adalah tubulus semeniferus. Tubulus semeniferus merupakan komponen penyusun testis yang terbesar. Apabila terjadi kerusakan atau atrofi sel-sel penyusun tubulus seminiferus akan terjadi penurunan berat testis (Hardiyono & Soekanto, 2013). Hasil penelitian memberikan bukti bahwa komponen dalam ekstrak daun mimba diduga tidak mempengaruhi tubulus seminiferus, sehingga tidak terjadi perbedaan bobot testis.

Faktor lain yang menyebabkan bobot testis tidak menunjukkan

perbedaan bermakna diduga karena testis telah mengalami kematangan spermatozoa. Dahril (2016) menyatakan bahwa tingkat kematangan testis dipengaruhi oleh struktur dan jumlah spermatozoa. Struktur spermatozoa normal pada tikus yaitu memiliki bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor lurus panjang, sedangkan spermatozoa abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan atau terlalu bengkok dan ekornya tidak lurus bahkan tidak berekor. Menurut Nontamart *et al.* (2013) Jumlah sel spermatozoa pada tikus normal yaitu berkisar antara 300 sampai 400 juta.

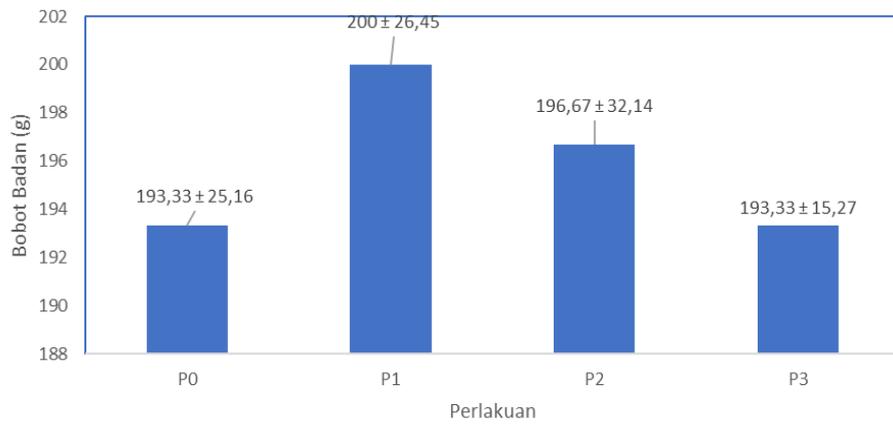
Hasil ANOVA pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Mimba terhadap GSI total tikus yang ditunjukkan pada histogram (Gambar 3) menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Mimba dapat menyebabkan Indeks Gonadosomatik rendah. Hasil uji Duncan menunjukkan P0 tidak berbeda bermakna ($P > 0,05$) dengan P1 dan P3, sedangkan P0, P1 dan P3 menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dengan P2 (**Tabel 1**).

Pemberian ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 60 mg/kgBB/hari (P1) dan dosis 100 mg/kgBB/hari (P3) tidak mampu menurunkan nilai GSI, sedangkan pemberian ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 80 mg/kgBB/hari (P2) mampu menurunkan nilai GSI. Hasil

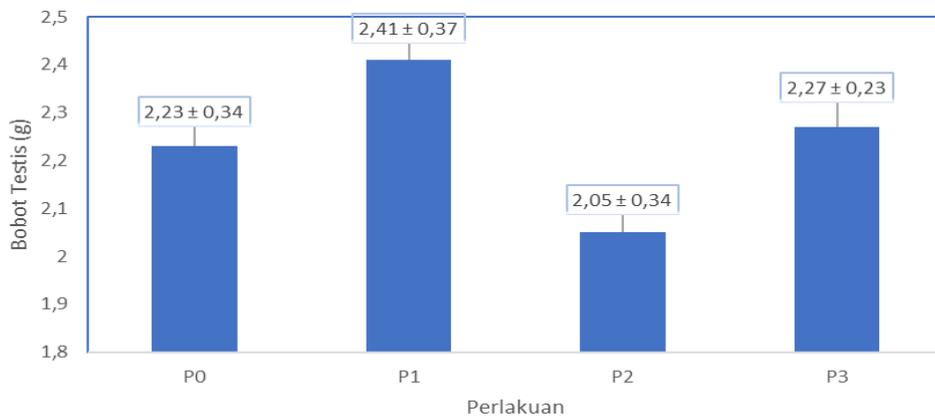
tersebut tidak sesuai dengan penelitian Muslichah (2013) yang menyatakan bahwa tingkat kematangan gonad dan bobot gonad pada tikus jantan mengalami penurunan seiring dengan peningkatan dosis ekstrak daun mimba yang diberikan.

Pemberian ekstrak etanol daun mimba yang tidak mampu menurunkan nilai GSI pada perlakuan P1 dan P3 ini diduga disebabkan karena variasi individu tiap spesies yang berbeda. Grandjean (2002) menyatakan bahwa variasi individu merupakan umpan balik dosis yang dibutuhkan untuk menghasilkan respon yang sesuai. Tubuh memiliki kapasitas tertentu untuk menahan efek yang berpotensi berbahaya pada paparan bahan kimia sehingga dapat menimbulkan efek yang berbeda. Hal tersebut diduga terjadi pada hewan uji kelompok P2.

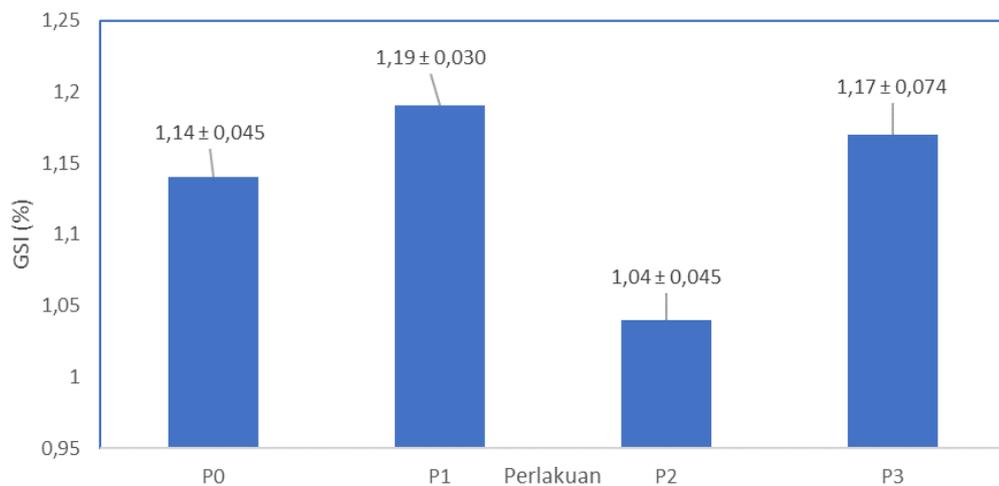
Data nilai GSI yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian perlakuan pada P2 memiliki pengaruh yang paling besar terhadap penurunan nilai GSI dibandingkan dengan perlakuan pada P1 dan P3. Faktor yang mempengaruhi nilai GSI adalah bobot badan dan bobot testis. Berdasarkan hasil uji ANOVA yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa bobot testis diduga yang paling mempengaruhi nilai GSI pada penelitian ini. Hal ini dapat dilihat dari hasil ANOVA pada **Tabel 1**. Rerata bobot testis pada P2 mengalami penurunan yang paling besar



Gambar 1. Histogram bobot tikus jantan setelah paparan ekstrak etanol daun mimba selama 14 hari



Gambar 2. Histogram bobot testis tikus jantan setelah paparan ekstrak etanol daun mimba selama 14 hari



Gambar 3. Histogram GSI tikus jantan setelah paparan ekstrak etanol daun mimba selama 14 hari

dibandingkan dengan P1 dan P3, sehingga menyebabkan nilai GSI pada P2 paling rendah jika dibandingkan dengan P1 dan P3.

Senyawa antifertilitas pada prinsipnya bekerja melalui efek hormonal yang menghambat laju metabolisme sel spermatogenik dengan cara mengganggu keseimbangan hormon (Wiryawan, 2009). Wijayanti (2016) menyatakan bahwa kandungan dalam daun mimba yang dapat memberikan efek antifertilitas yaitu saponin dan alkaloid. Saponin dan alkaloid digunakan sebagai bahan baku sintesis hormon steroid dan triterpenoid memiliki kaitan dengan biogenesis dengan steroid (Adnan, 2002). Hal tersebut diduga karena saponin ikut masuk ke dalam jalur biosintesa steroid terutama hormon estrogen sehingga akan dihasilkan bahan yang strukturnya mirip dengan hormon tersebut. Selanjutnya bahan ini disekresi bersama dengan hormon tersebut dalam sel target. Bahan tersebut akan masuk ke sel bersama dengan hormon, selanjutnya akan menempati reseptor hormon. Akibatnya aksi hormon pada sel target akan berkurang.

Perlakuan P1 diduga konsentrasi ekstrak daun mimba kurang sehingga tidak mampu memberikan efek pada regulasi hormon reproduksi. Perlakuan P3 ekstrak yang diberikan diduga menyebabkan kejenuhan pada reseptor

sehingga tidak mampu menginduksi perubahan konsentrasi hormon reproduksi dalam tubuh hewan uji. Kedua hal tersebut menyebabkan GSI pada P1 dan P3 tidak berbeda bermakna dengan P0. Lehninger (2003) menyatakan bahwa pengaruh dari peningkatan hormon pada sebagian besar sistem yang responsif adalah ketika reseptor secara relatif pada saat keadaan jenuh sehingga menyebabkan suatu respon hormon yang maksimal. Respon hormon yang maksimal ini menyebabkan hormon reproduksi yang dihasilkan menjadi lebih banyak. Sehingga tidak mempengaruhi GSI pada P1 dan P3.

Penelitian Apolonia (2017) menunjukkan bahwa histopatologi testis setelah perlakuan ekstrak daun mimba memiliki nilai rata – rata berat testis, sel Leydig, dan diameter tubulus seminiferus mencit (*Mus musculus*) yang lebih kecil dibanding dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh yang bermakna dari pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) Ukuran diameter tubulus seminiferus yang mengecil mencerminkan adanya hambatan spermatogenesis dan juga kemungkinan disebabkan penurunan jumlah sel Leydig (Fitriyah, 2005). Jumlah sel Leydig yang menurun pada testis diduga disebabkan karena senyawa saponin yang ada pada ekstrak daun mimba. Menurut Rekha &

Chandrasekhara (2014), pemberian saponin menyebabkan penekanan sintesis asam nukleat dan protein di dalam sel Leydig sehingga sintesis testosteron terhambat.

Hormon lain yang sangat berperan untuk menstimulasi fungsi fisiologis sel Leydig adalah LH. Fungsi utama LH adalah menstimulasi sel Leydig untuk memproduksi hormon testosteron. Stimulasi LH pada sel Leydig yang sedikit menyebabkan menurunnya sekresi hormon testosteron. Sekresi hormon testosteron yang menurun akan menghambat spermatogenesis dan menyebabkan turunnya bobot testis.

Folicle Stimulating Hormone (FSH) mengawali proses proliferasi spermatogenesis dan testosteron berdifusi dari sel interstitial yang diperlukan untuk pematangan akhir spermatozoa (Agarwal *et al.*, 2003). Pembentukan FSH yang terhambat menyebabkan spermatogenesis akan terganggu dan juga menyebabkan turunnya jumlah sel Sertoli (Guyton dan Hall, 2008). Menurut Boekelheide *et al.* (2000), terjadinya penurunan jumlah sel Sertoli mengindikasikan kegagalan fungsi sel Sertoli melindungi sel-sel germinal terhadap apoptosis. Kerusakan sel Sertoli akan mengganggu proses spermatogenesis. Lebih lanjut Lohiya *et al.* (2002) menyatakan jika fungsi sel Sertoli terganggu, maka sekresi ABP, suplai

nutrisi, faktor pertumbuhan, laktat, dan transferin juga terganggu karena zat-zat tersebut sangat dibutuhkan dalam proses spermatogenesis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun mimba pada dosis 80 mg/kgBB/Hari dengan waktu paparan selama 14 hari mampu menunjukkan efek antifertilitas pada tikus jantan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dengan sumber dana selain APBN Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro tahun anggaran 2018 sesuai Surat Penugasan Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Nomor: 1754I/UN7.5.8/PG/2018 dengan ketua proyek penelitian Dr. Agung Janika Sitaswi, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan. 2002. *Potensi Tumbuhan Sebagai Bahan Pengatur Fertilitas*. Makasar: Biologi, FMIPA, Universitas Muhammadiyah Makasar.
- Agarwal A, RA Saleh, & MA Bedaiwi. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *J. Fertil. Steril.* 79(4):829-843.
- Apolonia M & Sukarjati. 2017. Pengaruh ekstrak biji pepaya (*carica papaya* l.) dan ekstrak daun mimba (*azadirachta indica* a.juss) dan campuran ekstrak biji pepaya (*carica papaya* l.) dan

- ekstrak daun mimba (*azadirachta indica* a.juss) terhadap diameter tubulus seminiferus, sel leydig dan bobot testis mencit (*mus musculus*). *Stigma Journal of Science*, 10 (1): 5-11.
- Auta T & AT Hasan. 2016. Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of *Azadirachta indica* (neem) on male albino mice. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2016 1-5.
- Biswas K, I Chattopadhyay RK Banerjee, & U Bandyopadhyay. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*, 82(11): 8-9.
- Boekelheide K, SL Fleming, KJ Johnson, SR Patel, & HA Schoenfeld. 2000. Role of Sertoli cell in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 225(2):105-115.
- Burrow ME, SM Bone, BM Coelin, LI Meinik, BN Duana, SW Canter, TEWiese, TE Cleveland, & JA Mc Lachlan. 2001. Phytochemical Gliceolins Isolated from Soy Medicine Antihormonal Effect Through Estrogen Receptor Alpha and Beta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Apr. 86 (4) : 1750-1758.
- Chateau D & N Boehm. 1995. *Regulation of Differentiation and Keratin 10 Expression by All Trans Retinoid Acid during the Estrous Cycle in the Rat Vaginal Epithelium*. France: Institute d'Histologic, Faculte de Medicine, 4 Rue Kirschleger.
- Dahril, Dasrul, D Dhita, & M Reza. 2016. Analisis kualitas sperma tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan makanan tinggi kalori pada pemberian ekstrak manggis (*Garciana mangostana*). *Jurnal Ilmiah Sains*.4(2): 1-16
- Fitriyah. 2005. *Pengaruh Ekstrak Buah Pinang (Area catechu) Terhadap Hsitologi Testis Mencit (Mus musculus)*. Bandung: Pendidikan Bahasa Indonesia, FKIP, Univerista Pendidikan Indonesia.
- Grandjean P. 2002. Individual susceptibility to toxicity. *Toxicology Letters*. 64(2):43-51.
- Gufron H. 2005. Gambaran Histologik Spermatogenesis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) diberi Makan Terung Tukak (*Solanum forvum*). *Jurnal Kedokteran Yarsi* 2. 2(1): 1-11.
- Guyton AC & JE Hall. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi ke-11. Jakarta: EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Hardiyono H & Soekanto A. 2013. Pengaruh pemberian royal jelly peroral terhadap berat testis dan proporsi berat testis terhadap berat badan tikus Putih (*rattus norvegicus* strain wistar) jantan, *Jurnal Ilmiah Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma*, Surabaya. 10 (2): 176-182.
- JK Roop, PK Dhaliwal & SS Guraya. 2005. Extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* seeds inhibit folliculogenesis in albino rats.
- Kardinan A. 2000. *Pestisida Nabati, Ramuan dan Aplikasi*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya.
- Kristanti AN. 2010. Potensi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiata* (L) Urban) Dosis Tinggi Sebagai Antifertilitas Pada Mencit (*Mus musculus*) Betina. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Lehninger A, D Nelson, & MM Cox. 2003. *The Principle of Biochemistry* 2nd : United States: Academic Press.
- Lohiya NK, B Manivannan, PK Mishra, N Pathak, S Sriram, S Bhande, and S Panneerdoss. 2002. Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey. *Asian. J. Androl*, 4(1): 17-26.
- Morovati M, M Mahmond, & KM Ghazy. 2008. Sterility and Abortive Effects of the Commercial Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Extract NeemAzal-T/S on Female Rat (*Rattus*

- norvegicus*). Turk.J. Zool. 32: 155-162.
- Muslichah S & Wiratmo. 2013. 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. *BOPTN/DIPA UNEJ*, 2(1): 1-13.
- Nontamart N, W Tongjaroebuangan, R Srisawat. 2013. The memory enhancing effects of The Extract from the Fruit Hull of Mangosteen (*Garciana mangostana* L.) in Healthy Adult Male Rats. *International Proceedings of Chemical, Biological and Enviromental Engineering*. 55(1):117-121.
- Nurtiati H & T Widya. 2001. Pemanfaatan bioinsektisida ekstrak daun *Azadirachta indica* A. Juss. sebagai pengendali hayati ulat daun kubis *Plutella xyclostella*. *J. MIPA*, 6 (1).
- OMAFRA Factsheet Anatomy.
- Priya GK, Saravanam, & Renuka C. 2012. Medicinal Plants with Potential Antifertility Activity-A Review Of Sixteen Years of Herbal Medicine Research (1994-2010). *Int.J. PharmTech Res* 4: 485-488.
- Rekha S & S Chandrasekhara, 2014. Antifertility Effect of *Ziziphus jujuba* mill. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2(1):8-9.
- Rustidja R & CJJ Richter. 2001. Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Setiabudi J. 2015. Analisis prioritas kebijakan pemanfaatn burung hantu (*Tyto alba*) sebagai pengendalian hama tikus Sawah yang ramah lingkungan di kabupaten Semarang. *Indonesian Journal of Conservation*. Vol 4, No 1, ISSN: 2252-9195. Hlm. 67-73.
- Singleton GR. 2003. Impacts of Rodoents on Rice Production in Asia. *IRRI Discussion Paper Series* No.43. International Rice Research Institute. Los Banos. Philipines.
- Suryawanshi JAS. 2011. Neem-Natural Contraceptive for Male and Female-an Overview. *Int.J. Biomol & Biomed*. 1: 1-6.
- Susetyarini E. 2013. Aktivitas tanin daun beluntas terhadap konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan. *Jurnal GAMMA*. ISSN: 2086-3071. Hlm. 14-20.
- Upa FT, Saroyo & YK. Deidy. 2017. Komposisi pakan tikus ekor putih (*Maxomys hellwandii*) di kandang. *Jurnal Ilmiah Sains*. 17(1): 1-6.
- Wijayanti DN, S Muslichah, & E Puspitasari. 2016. Pengaruh ekstrak metanol biji pepaya tua dan ekstrak metanol biji pepaya muda (*carica papaya* l.) terhadap kualitas dan kuantitas spermatozoa tikus putih jantan (*rattus norvegicus*). *Jurnal Pustaka Kesehatan* 4(3) :495-500.
- Wirawan I & A Ida. 2009. Ekstrak Biji Klabet Menurunkan Jumlah Sel Spermatozoa pada Kelinci. *Jurnal Veteriner*, 10 (2) : 71-76.