

**EFEK EKSTRAK ETHANOL DAUN MIMBA TERHADAP GONADOSOMATIC
INDEX (GSI), JUMLAH DAN UKURAN
FOLIKEL ATRESIA PADA MENCIT (*Mus musculus* L.) BETINA**

Nurul Hidayah, Agung Janika Sitasiwi, Siti Muflichatun Mardiaty

Department of Biology Science and Mathematics Faculty, Diponegoro University, Semarang

Corresponding author : nurul.h@student.undip.ac.id

Abstract

Neem leaves contain flavonoid, triterpenoid and saponin compounds that have antifertility potential to suppress of reproduction rate of rodentia pests. The purpose of this study was to examine the effect of neem leaf ethanol extract on gonadosomatic index (GSI), number and size of atresia follicles in female mice. This study used a Completely Randomized Design Method consist of 5 treatments and 4 replications namely K + (Contraceptive Pills); K- (Aqua); P1, P2 and P3 (Treatment of neem leaf ethanol extract at dosage of 8.4 mg / kgBW, 11.2 mg / kgBW and 14 mg / kgBW). The treatment was administered orally at a volume of 0.2 ml / animal every morning for 21 days. Measurement of body weight was conducted at the beginning of treatment and every 7 days. The ovaries were isolated, weighed and histologically processed using paraffin method and H & E staining. the number and diameter of atresia follicles were counted on ovaries. The data was analyzed using ANOVA test and DMRT test at 95% confidence level. The results showed that neem leaf ethanol extract had no significant effect GSI and diameter of atresia follicle but had significant effect on the number of atresia follicle. It can be concluded that neem leaf ethanol extract can increase the number of atresia follicle in mice by suppressing the synthesis and action of reproductive hormone.

Keywords: *mimba leaf, atresia follicle, GSI, mice*

PENDAHULUAN

Mimba mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antifertilitas, baik pada hewan jantan maupun betina sehingga dapat digunakan untuk menekan pertumbuhan populasi hewan tersebut (Suryawanshi, 2011; Auta dan Hassan, 2016). Daun mimba mengandung senyawa flavonoid, triterpenoid dan saponin yang berpotensi sebagai antifertilitas (Aradilla, 2009; Suryawanshi, 2011; Auta dan Hasan, 2016). Saponin digunakan sebagai bahan dasar sintesis beberapa hormon steroid untuk bahan kontrasepsi oral (Apolonia dan Sukarjati, 2017). Flavonoid bersifat estrogenik yang dapat menempati reseptor

estrogen yang berada di dalam tubuh (Satyaningtjas dkk., 2014).

Mekanisme kerja senyawa antifertilitas dengan cara menghambat ovulasi dapat diketahui dengan melihat perkembangan folikel (Rusmiati, 2010). Perkembangan folikel dapat ditentukan dengan pengukuran diameter folikel. Folikel dapat berkembang menjadi folikel dominan untuk diovulasikan atau menjadi folikel non dominan atau folikel atresia (Trissatharra dkk., 2016). Roop *et al.* (2005) menyatakan bahwa pemberian ekstrak biji mimba secara oral dapat mengurangi jumlah rata-rata folikel pada tikus betina. Penelitian Alfian dkk. (2017) juga menunjukkan bahwa pemberian

senyawa antifertilitas dapat menurunkan jumlah folikel de Graaf pada ovarium mencit betina.

Penelitian Gbotolorun *et al.* (2008) dan Roop *et al.* (2005) menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba dapat mengurangi bobot ovarium, tingkat ovulasi, menghambat folikulogenesis dan pembentukan antrum dalam folikel. Perkembangan oosit di dalam ovarium seiring dengan perkembangan bobot gonad dapat meningkatkan nilai GSI (Hutagalung dkk., 2015). *Gonadosomatic Index* (GSI) adalah berat relatif gonad terhadap berat tubuh yang digunakan untuk memprediksi jumlah anakan yang dihasilkan (Flores *et al.*, 2015; Setyaningrum dan Wibowo, 2016).

Berlatar belakang masalah tersebut dilakukan penelitian tentang pengaruh kandungan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* Juss) terhadap *gonadosomatic index* (GSI), jumlah dan ukuran folikel atresia pada mencit betina. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh ekstrak ethanol daun mimba (*Azadirachta indica* Juss) terhadap *gonadosomatic index* (GSI), jumlah dan ukuran folikel atresia pada mencit betina. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh ekstrak ethanol daun mimba terhadap organ reproduksi mencit betina

sehingga dapat dijadikan rujukan tentang manfaat daun mimba untuk menekan reproduksi hama rodentia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan selama dua bulan di Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang. Rancangan penelitian yang digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 4 ulangan.

Persiapan hewan uji

Mencit betina galur Swiss Webster yang berumur 2,5 bulan dengan bobot badan 20-25 g diaklimasi pada kondisi laboratorium selama 7 hari dalam kandang agar dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang baru. Kandang hewan uji berupa kotak plastik berukuran 35 cm x 25 cm yang dilengkapi dengan penutup kawat ram berukuran 40 cm x 60 cm, sekam padi, tempat pakan dan tempat minum (Saputro, 2016). Pemberian pakan standar HI-PRO-VITE Medicated 594 dan minum dilakukan secara *ad libitum*.

Ekstraksi Daun Mimba

Sampel daun mimba yang akan digunakan berupa sampel segar yang diperoleh dari kawasan kampus FSM UNDIP. Sampel segar dibersihkan dan dikeringkan menggunakan oven selama ± 7 hari. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan blender. Metode

ekstraksi didasarkan pada penelitian Sitasiwi *et al.* (2017). Ekstraksi dilakukan dengan mencampurkan 100 g sampel dengan 1000 ml etanol 70%. Larutan diaduk secara teratur dan didiamkan pada suhu ruang selama 24 jam. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan evaporator sampai didapatkan hasil akhir dalam bentuk serbuk.

Persiapan Bahan Uji

Dosis ekstrak daun mimba yang diberikan mengacu pada penelitian Sitasiwi *et al.* (2017) adalah 8,4 mg/kgBB, 11,2 mg/kgBB dan 14 mg/kgBB yang dilarutkan dalam 10 ml air hangat. Larutan diberikan secara oral dengan volume 0,2 ml/mencit yang mengandung ekstrak daun mimba 0,168 mg; 0,224 mg dan 0,28 mg. Pembuatan sediaan pil kontrasepsi dengan dasar konversi dosis manusia ke mencit sebesar 0,00261 (Laurence dan Bacharach, 1964). Berdasar angka konversi tersebut, dosis untuk mencit ditentukan dengan cara mengencerkan 1 tablet (79,8 mg) ke dalam 7,16 ml akuades.

Pemberian Perlakuan dan Pengamatan

Perlakuan diberikan secara oral dengan volume 0.2 ml/ekor setiap pagi hari (08.00 – 10.30 WIB) selama 21 hari. Selama perlakuan dilakukan pengamatan konsumsi minum (setiap hari), konsumsi pakan (setiap 3 hari) dan bobot badan (setiap 7 hari). Pembedahan mencit dan

isolasi organ ovarium dilakukan pada hari ke- 22, kemudian dilakukan penimbangan bobot dan pembuatan sediaan histologis ovarium mencit. Pengamatan preparat dilakukan dengan fotomikrograf untuk menghitung jumlah folikel atresia pada perbesaran 100x dan diameter folikel atresia pada perbesaran 400x. Pengukuran GSI dihitung sesuai rumus menurut Naghdi *et al.* (2016) sebagai berikut.

$$GSI = \frac{BG}{BB} \times 100$$

Keterangan:

GSI = gonadosomatik indeks (%),

BG = bobot gonad (g),

BB = bobot tubuh (g)

Analisis Data

Data bobot badan, bobot ovarium, GSI, jumlah dan diameter folikel atresia dianalisis dengan uji One way ANOVA pada taraf kepercayaan 95%. Analisis data jumlah folikel atresia dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*)for Windows versi 20.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis data penelitian dari pemberian ekstrak ethanol daun mimba terhadap GSI, jumlah dan folikel atresia mencit betina ditunjukkan pada Tabel 1.

Hasil ANOVA gonadosomatik indeks (GSI) mencit betina menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antara perlakuan ekstrak daun mimba dengan kelompok kontrol. Rerata GSI pada masing-masing perlakuan memiliki nilai yang hampir sama. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba tidak memengaruhi nilai GSI pada mencit betina.

Hasil ANOVA terhadap jumlah folikel atresia ovarium mencit betina menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ekstrak daun mimba. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba dapat menyebabkan hambatan perkembangan folikel yang dibuktikan dengan adanya peningkatan jumlah folikel atresia. Uji lanjut Duncan menunjukkan yaitu tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) antara kelompok K(-) dengan perlakuan P1 dan P2, kelompok K(+) tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) dengan perlakuan P2 dan P3. Jumlah folikel atresia pada ovarium mencit betina mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan dosis ekstrak daun mimba yang diberikan. Hal ini dapat diduga bahwa kematian folikel disebabkan oleh senyawa antifertilitas dari ekstrak ethanol daun mimba.

Hasil ANOVA ukuran diameter folikel atresia menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antara kelompok kontrol dengan perlakuan ekstrak daun mimba. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diasumsikan bahwa pemberian ekstrak daun mimba tidak memengaruhi ukuran diameter folikel atresia pada mencit betina.

Gonadosomatic index (GSI) merupakan salah satu faktor penting yang memengaruhi reproduksi (Adebayo *et al.*, 2009). Penurunan gonadosomatik indeks akan memiliki konsekuensi pada fekunditas dan tingkat kesuburan (Oluwatoyin *et al.*, 2013). Nilai GSI yang diperoleh dari penelitian ini adalah 0,155 – 0,207 %. Hasil penelitian Wu *et al.* (2015) menunjukkan bahwa nilai GSI pada mencit betina galur Balb/c yang berumur 6 bulan kelompok kontrol adalah sekitar 0,0458 % dan hasil penelitian Singh dan Lata (2015) yang menunjukkan nilai GSI pada mencit betina galur Parke berumur 3 bulan adalah 1,6 %. Adebayo *et al.* (2009) menyatakan bahwa gonadosomatik indeks diukur dari berat gonad per berat badan dan dipengaruhi oleh jenis spesies, umur serta musim kawin.

Hasil penelitian ini menunjukkan peningkatan jumlah folikel atresia seiring dengan peningkatan dosis ekstrak ethanol daun mimba yang diberikan. Folikel atresia

Tabel 1. Rerata GSI, jumlah dan diameter folikel atresia mencit betina setelah pemberian ekstrak daun mimba selama 21 hari

Parameter	Perlakuan				
	K(+) $\bar{x} \pm SD$	K(-) $\bar{x} \pm SD$	P1 $\bar{x} \pm SD$	P2 $\bar{x} \pm SD$	P3 $\bar{x} \pm SD$
GSI (%)	0,164 ^a ±0,04	0,207 ^a ±0,07	0,188 ^a ±0,05	0,169 ^a ±0,05	0,155 ^a ±0,04
Jumlah Folikel Atresia	25,25 ^b ±8,73	8,75 ^a ±5,56	9,5 ^a ±8,89	18 ^{ab} ±6,93	28,5 ^b ±8,58
Diameter Folikel Atresia (µm)	121,10 ^a ±35,09	108,05 ^a ±30,04	134,17 ^a ±26,49	128,42 ^a ±12,42	101,88 ^a ±12,58

Keterangan : Angka yang diikuti oleh superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan tidak signifikan ($p>0,05$). K(+): kontrol dengan sediaan pil kontrasepsi, K(-): kontrol dengan pelarut air, P1: perlakuan dengan ekstrak etanol daun mimba dosis 8,4 mg/kgBB, P2: perlakuan dengan bahan uji dosis 11,2mg/kgBB, P3: kelompok perlakuan dengan bahan uji dosis 14 mg/kgBB.

merupakan kondisi folikel yang tidak sempurna atau rusak selama masa perkembangannya (Mastuti dan Ciptono, 2017). Hasil penelitian Trissatharra dkk. (2016) menunjukkan bahwa rerata jumlah folikel atresia mencit betina kelompok kontrol berkisar antara 1-9. Hasil penelitian ini menunjukkan jumlah folikel atresia pada kelompok kontrol negatif masih dalam kisaran normal yaitu $8,75 \pm 5,56$ dan semakin meningkat seiring peningkatan dosis ekstrak daun mimba yang diberikan. Hal ini diduga karena senyawa antifertilitas yang terkandung dalam ekstrak etanol daun mimba dapat mengganggu perkembangan folikel sehingga terbentuk folikel atresia.

Ekstrak daun mimba memiliki potensi sebagai antifertilitas (Sharma *et al.*,

2013). Daun mimba memiliki kandungan senyawa flavonoid, triterpenoid dan saponin (Handayani, 2011; Apolonia dan Sukarjati, 2017). Flavonoid mempunyai efek estrogenik yaitu dapat bekerja seperti estrogen karena dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Satyaningtijas dkk., 2014). Flavonoid merupakan fitoestrogen yang paling kuat (Resende *et al.*, 2013). Fitoestrogen dapat menyebabkan estrogen alami tidak dapat berikatan dengan reseptornya dan akan meningkatkan jumlah estrogen bebas dalam darah (Liu *et al.*, 2013). Kadar estrogen yang tinggi di dalam darah dapat menyebabkan sekresi FSH terhambat sehingga perkembangan folikel di dalam ovarium juga terhambat. Perkembangan folikel yang terhambat ini

akan menyebabkan terbentuknya folikel atresia (Rejeki dkk., 2017).

Triterpenoid dan saponin juga dapat menyebabkan efek sitotoksik Satriyasa (2016). Senyawa triterpenoid yang memberikan efek sitotoksik dapat mengganggu metabolisme sel germinal (Wijayanti dkk., 2016). Saponin dapat mengaktifkan jalur apoptosis secara intrinsik maupun ekstrinsik, menahan siklus sel dan memicu autofagositosis (Tussanti dkk., 2014). Saponin bersifat sitotoksik terhadap sel terutama yang sedang mengalami perkembangan seperti pada saat oogenesis (Nurliani, 2007; Laili, 2016). Sifat sitotoksik dari ekstrak daun mimba menyebabkan struktur dan fungsi sel granulosa terganggu. Sel granulosa yang mengalami gangguan juga menyebabkan sintesis hormon 17- β -estradiol terganggu (Asif, 2013; Sitasiwi *et al.*, 2017). Apoptosis yang terjadi pada lapisan sel granulosa menyebabkan folikel tidak mencapai tahap ovulasi dan menyebabkan terbentuknya folikel atresia (Li, *et al.*, 2016).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak ethanol daun mimba tidak memengaruhi ukuran diameter folikel atresia. Rerata diameter folikel atresia yang diperoleh berkisar antara 101,88 – 134,17 μm . Hasil tersebut

menunjukkan bahwa rerata diameter folikel atresia memiliki ukuran yang sama dengan folikel antral. Hal ini diduga karena senyawa estrogenik dari ekstrak ethanol daun mimba hanya memengaruhi folikel antral, sedangkan folikel pada masa awal perkembangan tidak terpengaruh. Baerwald *et al.* (2009) menyatakan bahwa perkembangan folikel preantral lebih dipengaruhi oleh nutrisi daripada gonadotropin, sedangkan perkembangan folikel sekunder dan tersier lebih dipengaruhi oleh stimulasi gonadotropin. Hasil tersebut diperkuat dengan pernyataan Orisaka *et al.* (2009) yaitu atresia atau apoptosis sel granulosa tampak jelas dalam fase preantral dan awal folikel antral. Tahap transisi dari preantral ke awal antral adalah fase folikel yang rentan mengalami atresia.

Fase transisi folikel preantral ke folikel antral, androgen memiliki peran yang lebih penting daripada estrogen (Drummond, 2006) Androgen berfungsi untuk merangsang pertumbuhan folikel preantral dan mitosis sel granulosa, meningkatkan kerja FSH di dalam folikel dengan cara meningkatkan ekspresi reseptor FSH, aktivitas aromatase sel granulosa yang diinduksi FSH dan proliferasi serta pertumbuhan folikel (Cardinas *et al.*, 2002). Androgen

disintesis di sel teka yang distimulasi oleh LH dan reseptor androgen paling tinggi terdapat pada fase preantral dan awal folikel antral (Orisaka *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak ethanol daun mimba dapat meningkatkan jumlah folikel atresia namun tidak memengaruhi GSI dan ukuran

diameter folikel atresia pada mencit (*Mus musculus L.*) betina.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro melalui No.042.01.2.400898 / 2016 DIPA Research Grant pada tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Adebayo AO, B.O. Oke, dan A. K. Akinloye. 2009. Characterizing the gonadosomatic index and its relationship with age in greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*, temminck). *J. Vet. Anatomy* 2(2): 53 – 59.
- Alfian MAJ., A.J. Sitasiwi, dan M.A. Djaelani. 2017. Efek antifertilitas ekstrak air biji pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap jumlah dan diameter folikel de Graaf mencit (*Mus musculus*) betina. *Jurnal Pro-Life* (1) : 476-486.
- Apolonia M. dan 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.
- Aradilla AS. 2009. Uji efektifitas larvasida ekstrak ethanol daun mimba (*A. Indica*) terhadap larva *Aedes aegypti*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Asif M. 2013. A review on spermicidal activities of *Azadirachta indica*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(5): 61-80.
- Auta T. and A.T. Hassan. 2016. Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of (neem) – a review. *Annals of Biological Research*. 1(2) : 108-113.
- Baerwald AR, R.A. Walker, dan R.A. Pierson. 2009. Growth rates of ovarian follicles during natural menstrual cycles, oral contraception cycles and ovarian stimulation cycles. *Fertility and Sterility* 91(2) : 440-449.
- Cardenas H, J.R. Herrick, dan W.F. Pope. 2002. Increased ovulation rate in gilts treated with dihydrotestosterone. *Reproduction* 123:527-33.
- Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* 4(16).
- Flores A, R. Wiff, and E. Díaz. 2015. Using the gonadosomatic index to estimate the maturity ogive: application to Chilean hake (*Merluccius gayi gayi*). *ICES Journal of Marine Science*, Volume 72, Issue 2, Pages 508–514.
- Gbotolorun SC, A.A. Osinubi, C.C. Noronha, dan A.O. Okanlawon.

2008. Antifertility potential of *neem* flower extract on adult female sprague-dawley rats. *African Health Sciences* 8 (3) : 168-173.
- Handayani SM, M. Djatmiko, dan Y. Anas. 2011. Uji aktifitas repellent fraksi n-heksana ekstrak etanolik daun mimba terhadap nyamuk aedes aegypti. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara.
- Hutagalung RA, M.S. Widodo, dan A.R. Faqih. 2015. Evaluasi aplikasi hormon pmsg terhadap indeks gonadosomatik dan indeks hepatosomatik ikan gabus. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 14(1): 24-29.
- Laili NDH, T. Nofianti, dan F.I. Sari. 2016. Uji antifertilitas ekstrak etanol daun srikaya (*annona squamosa* l.) terhadap mencit putih betina bunting galur swiss webster. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada* 13(1) : 51-55.
- Laurence DR. dan A.L. Bacharach. 1964. *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics*. London: Academic Press.
- Li J, H.Gao, Z.Tian, Y. Wu, Y. Wang, Y. Fang, L. Lin, Y.Han, S. Wu, I. Haq, dan S. Zeng. 2016. Effects of chronic heat stress on granulosa cell apoptosis and follicular atresia in mouse ovary. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2016) 7:57.
- Liu T, D. Hou, Q. Zhao, W. Liu, P. Zhen, J. Xu, K. Wang, H. Huang, X. Li, H. Zhang, H. Xu, dan W. Wang. 2013. Phytoestrogen α -zearalanol attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *BioMed Research International* 2013 : 1-12.
- Mastuti RQD dan Ciptono. 2017. Pengaruh pemberian ekstrak kacang merah (*phaseolus vulgaris*, l.) terhadap perkembangan folikel ovarium tikus putih (*rattus norvegicus*, l.). *Jurnal Prodi Biologi UNY* 6 (3): 131-141.
- Naghdi M, M. Maghbool, M.S. Zade, M. Mahaldashtian, Z. Makoolati, S.A. Kouhpayeh, A.Ghasemi, and N. Fereydouni. 2016. Effects of common fig (*ficus carica*) leaf extracts on sperm parameters and testis of mice intoxicated with formaldehyde. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Vol. 2016 p : 1-9.
- Nurliani A. 2007. Penelusuran potensi antifertilitas kulit kayu durian (*durio zibethinus murr.*) melalui skrining fitokimia. *Journal Sains dan Terapan Kimia* 2(1): 53-58.
- Oluwatoyin AO, O. M. Olugbenga, F. A. Peter, dan O. David. 2013. Gonadosomatic index of female wister rats treated with graded concentration of aloe vera gel. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(7) : 339-342
- Orisaka M, K. Tajima, B.K. Tsang, dan F. Kotsuji. 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research* 2(9): 1-7.
- Resende FA, A.P.S. Oliveira, M.S. Camargo, W. Vilegas, dan E.A. Varanda. 2013. Evaluation of estrogenic potential of flavonoids using a recombinant yeast strain and mcf7/bus cell proliferation assay. *PLOS ONE* 8 (10) : 1-7.
- Rusmiati R. 2010. Pengaruh ekstrak metanol kulit kayu durian (*durio zibethinus murr*) pada struktur mikroanatomi ovarium dan uterus mencit (*mus musculus* l) betina. *Sains dan Terapan Kimia*, 4(1) : 29 – 37.
- Roop JK, P.K. Dhaliwal and S.S. Guraya. 2005. Extracts of *azadirachta indica* and *melia azedarach* seed inhibit folliculogenesis in albino rats.

- Nurul Hidayah, Agung J. Sitasiwi, Siti M. Mardiaty : Efek Ekstrak Ethanol Daun Mimba Terhadap Gonadosomatic Index (GSI), Jumlah dan Ukuran Folikel Atresia pada Mencit (*Mus Musculus L.*) Betina
- Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38 : 943-947.
- Saputro RW. 2016. Respon histologi hipokampus tikus wistar stress setelah perlakuan suplemen daging ikan gabus (*channa striata*) dalam pakan. *Skripsi*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Satriyasa BK. dan W. I. Pangkahila. 2010. Fraksi heksan dan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda menghambat spermatogonia mencit (*mus musculus*) jantan. *Jurnal Veteriner* 11: 36-40.
- Satyaningtijas AS, H. Maheswari, P. Achmadi, W.A. Pribadi, S. Hapsari, D. Jondriatno, I. Bustaman, dan B. Kiranadi. 2014. Kinerja reproduksi tikus bunting akibat pemberian ekstrak etanol purwoceng. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8(1) : 35-37.
- Setyaningrum N. dan E.S. Wibowo. 2016. Potensi reduksi ikan air tawar sebagai baby fish. *Biosfera* 33 (2) : 85-91.
- Sharma P, A. Sharma, M. Agarwal, dan S.C. Joshi. 2013. A review on antifertility efficacy of plants in males. *Int J Pharm Bio Sci* 4(4): 413 – 428.
- Singh S. dan S. Lata. 2015. Effect of exposure to di-butyl phthalate on reproductive physiology in adult female mouse. *IJPSR* 6(11): 4788-4795.
- Sitasiwi AJ, S. Isdadiyanto, dan S.M. Mardiaty. 2017. The estradiol 17- β concentration in mice after treated with ethanolic leaf extract of *azadirachta indica* (neem). *Proceeding of International Conference on Global Resource and Conservation*.
- Sitasiwi AJ. 2018. Bobot badan mencit (*mus musculus l.*) setelah pemberian ekstrak ethanol daun nimba (*azadirachta indica*) secara oral selama 21 hari. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 3 (1) : 133-139.
- Suryawanshi JAS. 2011. Neem- natural contraceptive for male and female an overview. *Int.J.Biomol and Biomed* 1:1-6.
- Resende FA, A.P.S. Oliveira, M.S. Camargo, W. Vilegas, dan E.A. Varanda. 2013. Evaluation of estrogenic potential of flavonoids using a recombinant yeast strain and mcf7/bus cell proliferation assay. *PLOS ONE* 8 (10) : 1-7.
- Rejeki RT, T. Harjana dan Sukiya. 2013. Pengaruh ekstrak daun kenari (*canarium indicum*, l.) terhadap perkembangan folikel ovarium tikus putih betina (*rattus norvegicus*, l.). *Jurnal Prodi Biologi UNY* 6 (3) : 194-203.
- Trissatharra A, S.R. Dwiningsih dan R.S. Munir. 2016. Pengaruh monoklonal antibodi bovine zona pelusida 3 (bzip3) terhadap diameter dan atresia folikel ovarium mencit (*mus musculus*). *Majalah Obstetri & Ginekologi* 24(1): 37-42.
- Tussanti I, A. Johan dan Kisdjamiatun. 2014. Sitotoksitas in vitro ekstrak etanolik buah parijoto (*medinilla speciosa*, reinw.ex bl.) terhadap sel kanker payudara t47d. *Jurnal Gizi Indonesia* 2(2): 53-58.
- Wijayanti DN, S.Muslichah dan 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.
- Wu J, M. Yuan, Y. Song, F.Sun and X. Han. 2016. Mc-Ir exposure leads to subfertility of female mice and induces oxidative stress in granulosa cells. *Toxins* 5(7): 5212–5223.