

EFEK EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban) TERHADAP PERKEMBANGAN SEL SPERMATID TIKUS (*Rattus norvegicus*)

The Effect of Centella Leaf Extract (Centella asiatica (L.) Urban) on Spermatid Development of Rat (Rattus norvegicus)

Wahyu Sihombing¹, Muslim Akmal², Sri Wahyuni³, Idawati Nasution³, Rinidar⁴, dan Hamdan⁵

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Embriologi Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁵Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: wahyusihombing@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek pemberian ekstrak daun pegagan terhadap perkembangan sel spermatid tikus. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola *one way analysis of varian* (ANOVA). Tikus yang digunakan adalah tikus jantan berumur 3,5 bulan dengan bobot badan 150-250 g sebanyak 12 ekor tikus. Tikus-tikus tersebut dikelompokkan menjadi empat kelompok perlakuan dengan masing-masing tiga ulangan. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol (K0) yang tidak diberi perlakuan, sedangkan kelompok K1, K2, dan K3 diberi perlakuan berupa ekstrak daun pegagan dengan dosis bertingkat, yaitu 125, 250, dan 500 mg/kg bobot badan selama 30 hari. Pada akhir perlakuan, tikus dikorbankan dengan diberi eter, lalu testis dinekropsi untuk selanjutnya dibuat preparat histologis. Preparat histologis diwarnai dengan pewarnaan *periodic acid Schiff* (PAS) untuk mengetahui perkembangan sel spermatid dengan cara mendeteksi karbohidrat netral pada tudung akrosom sel spermatid tersebut. Data dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa rata-rata jumlah sel spermatid mengalami penurunan dibandingkan kontrol (K0). K0 mempunyai rata-rata jumlah sel spermatid tertinggi yaitu 308,00±56,33; diikuti oleh K1 yaitu 234,38±19,81; K2 yaitu 218,50±5,48; dan K3 yaitu 208,05±27,35. Hasil uji statistik menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan ($P<0,05$) antara dosis dan rata-rata jumlah sel spermatid antara K0 dengan K2 dan K0 dengan K3. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun pegagan dapat mengurangi laju perkembangan sel spermatid tikus.

Kata kunci: ekstrak daun pegagan, tudung akrosom, sel spermatid, pewarnaan PAS, *Rattus norvegicus*

ABSTRACT

The aim of this research was to find out the effect of *Centella leaf extract* on spermatid development on rat. This research used completely randomized design *one way analysis of varian* (ANOVA). Twelve 3.5 months old rats weighing of 150 to 250 g were used in this study. The rats were equally divided into four groups with three replications. Group K0 was negative control group, K1, K2, and K3 were treated with *Centella leaf extract* with the concentration of 125, 250, and 500 mg/kg, respectively. The treatment was done for 30 days. At the end of the treatment, the rats were sacrificed and the testes was collected then processed for histological examination. The histological slide was stained using *periodic acid Schiff* (PAS) to observe the spermatid development by detecting the present of neutral carbohydrate in spermatid acrosome cap. The data were analyzed with ANOVA. The results showed that the average number of spermatid cells from treatment groups was lower than that of control group. The highest number of spermatid cells was showed in K0 (308.00±56.33) followed by K1 (234.38±19.81), K2 (218.50±5.48), and K3 (208.05±27.35). The statistical analysis showed that there were significance differences ($P<0.05$) between K0 and K2, K0 and K3. In conclusion, the *Centella leaf extract* reduce the spermatid development rate.

Key words: *pegagan leaf extract*, acrosome cap, spermatid, PAS staining, *Rattus norvegicus*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tanaman obat sebagai alat kontrasepsi sangat diperlukan, karena selain mudah didapat, harganya murah, dan aman untuk dikonsumsi. Salah satu tanaman yang telah diketahui memiliki sifat antifertilitas adalah daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) (Chuthbert dan Wong, 1986). Beberapa bahan aktif yang terkandung dalam pegagan antara lain triterpenoid saponin dengan unsur utamanya terdiri dari asiatikosida dan madekassosida, genin triterpen, minyak esensial, flavonoid, fitosterol, dan gula. Bahan aktif lainnya adalah tanin, asam amino, asam lemak, alkaloid, dan garam-garam mineral (Kumar dan Gupta, 2006).

Daun pegagan telah terbukti bekerja baik sebagai antifertilitas pada mencit jantan dengan mengurangi jumlah spermatozoa. Hasil penelitian Noor dan Ali

(2004), menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun pegagan dapat menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatogenik. Hal tersebut diperkuat oleh penelitian Hasanah (2009) yang membuktikan bahwa ekstrak daun pegagan dapat menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik yang meliputi sel spermatogonium dan spermatosit dengan dosis 125 mg/kg bobot badan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak daun pegagan dapat mengganggu spermatogenesis. Khasiat antifertilitas yang dimiliki daun pegagan menjadikan tanaman tersebut berpotensi digunakan sebagai bahan kontrasepsi bagi pria.

Spermatogenesis merupakan proses pembentukan spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus testes (Fawcett, 2002). Spermatozoa terbagi atas kepala dan ekor. Pada bagian kepala spermatozoa terdapat tudung akrosom yang melapisi dua per tiga bagian anterior kepala

(Toelihere, 1993). Akrosom merupakan suatu kantung kecil yang mengandung enzim hidrolitik yaitu *acrosin*, *hyaluronidase*, *esterase*, dan *acid hydrolase* yang berfungsi dalam fertilisasi (Garner dan Hafez, 2000).

Aktivitas pembentukan tudung akrosom di bagian proksimal dari sel spermatid merupakan proses penting dalam perkembangan sel-sel spermatid. Pendeteksian aktivitas pembentukan tudung akrosom tersebut dapat dilakukan dengan mendeteksi kandungan karbohidrat netral dan menurut Malini *et al.* (1998) merupakan senyawa yang sangat diperlukan dalam proses tersebut. Menurut Kiernan (1990), karbohidrat yang tersebar di permukaan jaringan dapat dideteksi dengan pewarnaan histokimia.

Teknik pewarnaan histokimia dapat dibagi atas dua golongan, yaitu pendeteksian karbohidrat yang bersifat asam dengan histokimia *alcian blue* (AB) dan karbohidrat yang bersifat netral dengan histokimia *periodic acid Schiff* (PAS) (Kiernan, 1990). Metode tersebut telah diaplikasikan pada berbagai penelitian seperti pada muncak (*Muntiacus muntjak muntjak*) (Wahyuni, 2012) dan monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) (Dreef *et al.*, 2007) yang mendeteksi sebaran karbohidrat netral pada proses spermatogenesis.

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, diketahui bahwa pegagan yang memiliki beberapa komponen bioaktif dapat dimanfaatkan sebagai kandidat bahan kontrasepsi bagi pria, karena telah terbukti sebagai antifertilitas pada mencit jantan. Namun demikian untuk membuktikan potensi daun pegagan sebagai bahan kontrasepsi, terlebih dahulu perlu dilakukan uji potensinya pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dilakukan pada penelitian ini. Uji tersebut difokuskan terhadap perkembangan sel-sel spermatid yang meliputi sel spermatid berbentuk bulat (*round spermatid*), sel spermatid berbentuk oval (*elongating spermatid*), dan sel spermatid berbentuk panjang (*elongated spermatid*). Pendeteksian perkembangan sel-sel spermatid tersebut dilakukan dengan mendeteksi kandungan karbohidrat netral pada tudung akrosom sel spermatid menggunakan metode histokimia PAS.

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek pemberian ekstrak daun pegagan terhadap perkembangan sel spermatid tikus jantan *strain* Wistar. Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini yaitu memberi informasi tentang khasiat daun pegagan sebagai bahan kontrasepsi bagi pria, menambah pengetahuan baru dalam pengembangan tanaman obat tradisional, khususnya di bidang ilmu reproduksi, dan membantu pemerintah dalam menyukseskan program keluarga berencana (KB).

MATERI DAN METODE

Pembuatan Ekstrak Daun Pegagan

Daun pegagan disortasi basah agar terpisah dari kotoran yang melekat, lalu dicuci sampai bersih. Setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena sinar matahari langsung sampai kering kira-kira selama 3 hari. Daun pegagan yang

telah kering, direndam dalam etanol 70% selama 2 hari sambil diaduk. Kemudian hasil rendaman tersebut disaring pertama dengan saringan teh kemudian dilanjutkan dengan kertas saring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat tersebut dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai pelarut menguap hingga diperoleh ekstrak yang kental.

Pembuatan Preparat Histologi

Organ testis yang telah difiksasi dengan larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10%, direndam dalam larutan alkohol 70% (*stopping point*) untuk diproses menjadi preparat histologi. Prosedur pembuatan preparat histologi hingga pewarnaan histokimia PAS mengacu pada Kiernan (1990). Prosedur tersebut dimulai dari proses dehidrasi menggunakan larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%, dan absolut), penjernihan dengan larutan silol, infiltrasi jaringan dalam parafin infiltrasi dengan tiga kali ulangan, dan dilanjutkan dengan penanaman (*embedding*) dalam parafin dan dicetak hingga menjadi blok parafin (*blocking*). Selanjutnya blok jaringan dipotong (*sectioning*) menggunakan mikrotom dengan ketebalan sayatan 3 μ m. Hasil sayatan diletakkan pada permukaan gelas objek. Jumlah *slide* yang akan diwarnai dengan pewarnaan PAS adalah 3 *slide* untuk setiap sampel testis.

Prosedur Pewarnaan PAS

Slide jaringan sebelum diwarnai, terlebih dahulu dihilangkan parafinnya (deparafinisasi) dengan larutan silol (3 kali ulangan). Tahap berikutnya adalah perendaman *slide* dalam alkohol absolut (3 kali ulangan), alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70%, serta dibilas dengan air mengalir dan akuades, selanjutnya dioksidasi dalam larutan *orthoperiodic acid* 0,5-1% selama 5 menit, diikuti pembilasan dengan akuades. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam larutan Schiff *reagent* selama 15 menit dan dilanjutkan dengan pembilasan dengan air sulfat selama 5 menit. Dilakukan kembali pembilasan dengan akuades selama 5 menit dan di *Counterstain* dengan Meyer's hematoksin, untuk mewarnai latar jaringan. Reaksi positif dari pewarnaan PAS ditandai dengan terbentuknya warna magenta pada jaringan yang diperiksa (Kiernan, 1990). Prosedur terakhir adalah dehidrasi, *clearing*, dan *mounting* serta ditutup dengan gelas penutup menggunakan bahan perekat Entellan®.

Hasil pewarnaan histokimia PAS diamati di bawah mikroskop dan difoto menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera pada pembesaran lensa objektif 4, 10, dan 40 kali.

Analisis Data

Pengamatan perkembangan sel spermatid difokuskan pada tubuli seminiferi *stage* IV, VI, X, dan XIII. Jumlah tubulus yang dihitung adalah 12 tubulus per kelompok perlakuan. Data hasil perhitungan jumlah sel spermatid tersebut yang meliputi *round spermatid*, *elongating spermatid*, dan *elongated spermatid*

dianalisis dengan menggunakan *analysis of varian* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap Jumlah Sel Spermatid

Ekstrak daun pegagan berefek terhadap penurunan jumlah sel spermatid pada seluruh kelompok perlakuan (K1, K2, dan K3) dibandingkan kelompok kontrol (K0). Data hasil perhitungan jumlah sel spermatid tersebut disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Kelompok K0 mempunyai rata-rata jumlah sel spermatid tertinggi yaitu 308,00±56,33, diikuti oleh K1 yaitu 234,38±19,81, K2 yaitu 218,50±5,48, dan

rataan jumlah sel spermatid terendah ditemukan pada K3 yaitu 208,05±27,35. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak daun pegagan dengan dosis meningkat dapat menurunkan jumlah sel spermatid. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan (P<0,05) tingkatan dosis terhadap rata-rata jumlah sel spermatid. Uji lanjutan dengan uji Tukey HSD menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel spermatid berbeda nyata (P<0,05) antara K0 dengan K2 dan K0 dengan K3. Kurva rata-rata jumlah sel spermatid akibat pemberian ekstrak daun pegagan pada kelompok kontrol dan perlakuan disajikan pada Gambar 1, sedangkan gambaran perkembangan sel spermatid pada *stage* IV, VI, X, dan XIII disajikan pada Gambar 2.

Tabel 1. Rataan jumlah sel spermatid setelah pemberian ekstrak daun pegagan selama 30 hari berturut-turut

Kelompok perlakuan	Sel spermatid			Total
	Round spermatid	Elongating spermatid	Elongated spermatid	
K0	118,50	147,00	95,00	360,50
	98,50	66,00	84,00	248,50
	159,00	81,00	75,00	315,00
K1	104,50	58,00	77,66	240,16
	112,00	49,00	51,33	212,33
	124,00	74,00	52,66	250,66
K2	100,50	71,00	51,33	222,83
	82,00	82,00	48,33	212,33
	101,00	63,00	56,33	220,33
K3	116,50	47,00	31,33	194,83
	105,50	79,00	55,00	239,50
	88,50	47,00	54,33	189,83

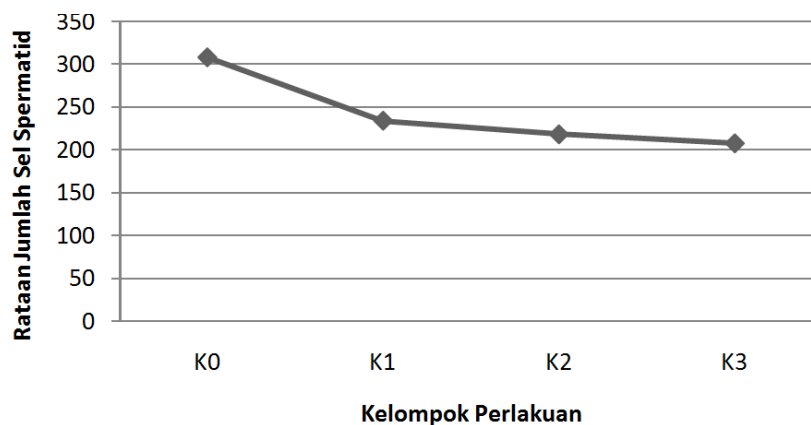
K0 (pakan komersial tanpa pemberian ekstrak daun pegagan)
 K1 (pakan komersial dengan pemberian ekstrak daun pegagan 125 mg/kg bobot badan)
 K2 (pakan komersial dengan pemberian ekstrak daun pegagan 250 mg/kg bobot badan)
 K3 (pakan komersial dengan pemberian ekstrak daun pegagan 500 mg/kg bobot badan)

Tabel 2. Rataan ±SD jumlah sel spermatid setelah pemberian ekstrak daun pegagan selama 30 hari berturut-turut

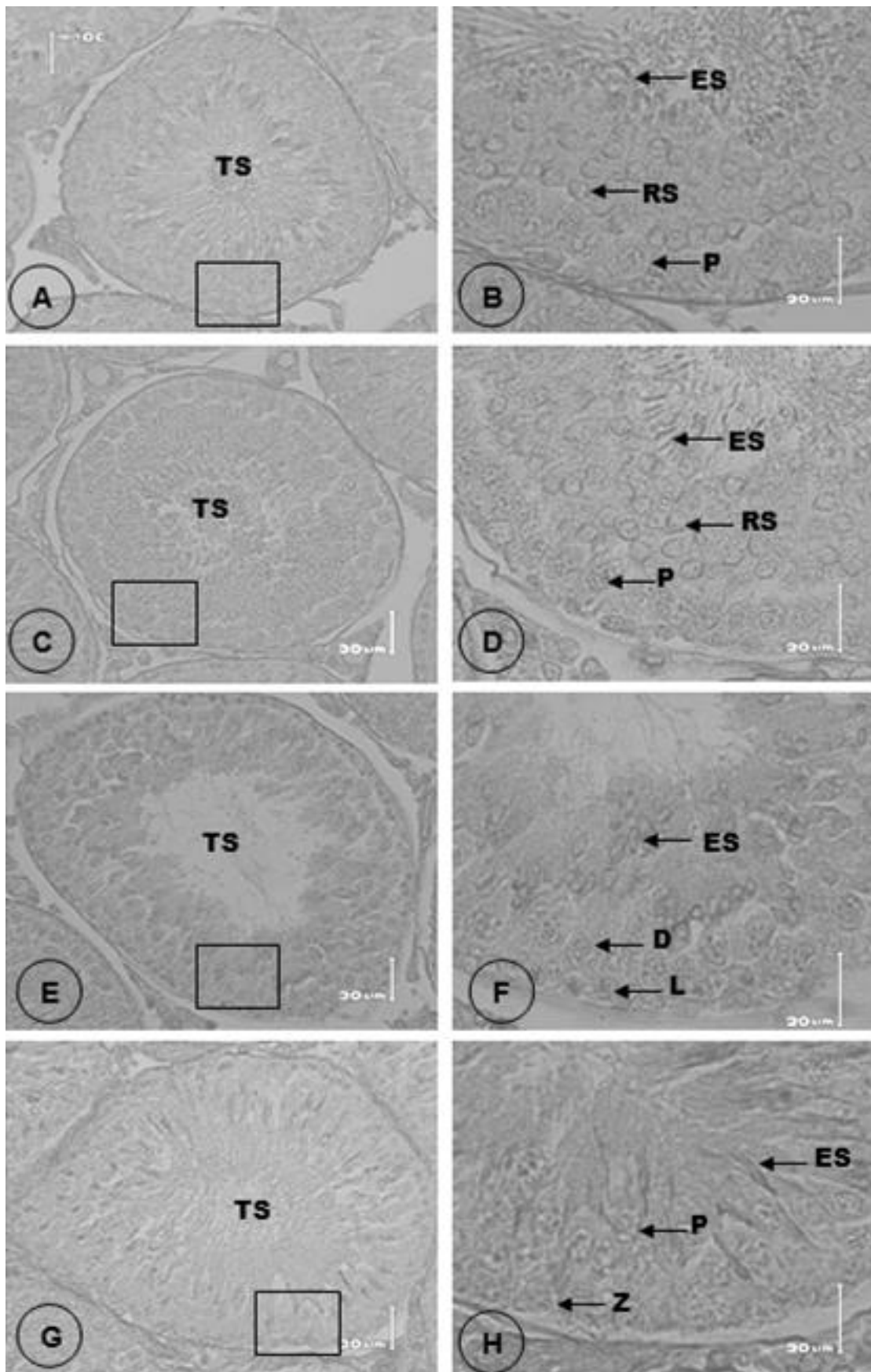
Kelompok perlakuan	Jumlah sel spermatid
K0	308,00±56,33 ^b
K1	234,38±19,81 ^a
K2	218,50±5,48 ^a
K3	208,05±27,35 ^a

^{a,b}Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

K0 (pakan komersial tanpa pemberian ekstrak daun pegagan)
 K1 (pakan komersial dengan pemberian ekstrak daun pegagan 125 mg/kg bobot badan)
 K2 (pakan komersial dengan pemberian ekstrak daun pegagan 250 mg/kg bobot badan)
 K3 (pakan komersial dengan pemberian ekstrak daun pegagan 500 mg/kg bobot badan)



Gambar 1. Kurva rata-rata jumlah sel spermatid



Gambar 2. Profil perkembangan sel spermatid. A= Tubulus seminiferus (TS) stage IV, B= Inset A, round spermatid (RS), elongated spermatid (ES), dan pachyten (P), C= Tubulus seminiferus (TS) stage VI. D= Inset C, round spermatid (RS), elongated spermatid (ES), dan pachyten (P), E= Tubulus seminiferus (TS) stage X, F= Inset E, elongating spermatid (ES), diakinese (D), dan leptoten (L), G= Tubulus seminiferus (TS) stage XIII, H= Inset G, elongated spermatid (ES), pachyten (P), dan zigoten (Z). Pewarnaan PAS.

Penurunan jumlah sel spermatid yang meliputi *round* spermatid, *elongating* spermatid, dan *elongated* spermatid tikus diduga dipengaruhi oleh zat triterpenoid glikosida, tanin, dan zat flavonoid dalam ekstrak daun pegagan yang diberikan selama 30 hari. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun pegagan tersebut diduga memiliki sifat sebagai antifertilitas.

Menurut Satriyasa (2008), penurunan jumlah sel spermatid akibat zat triterpenoid glikosida diduga terjadi melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah terganggunya fungsi sel Sertoli yang menyebabkan suplai laktat dan piruvat mengalami penurunan. Laktat dan piruvat adalah senyawa hasil pemecahan dari karbohidrat yang digunakan sebagai sumber energi bagi sel spermatid. Hal tersebut juga diungkapkan oleh Grootegoed *et al.* (1984) yang menyatakan bahwa energi berupa *adenosine triphosphate* (ATP) dari sel spermatid berasal dari degradasi laktat dan piruvat yang diproduksi oleh sel Sertoli. Courtens dan PiÖen (1999) mengungkapkan bahwa pada tikus yang mengalami *cryptorchid* dimana konsentrasi laktat berkurang, tidak ditemukan adanya *elongating* spermatid, spermatosit primer dan *round* spermatid ruptur ke lumen tubulus seminiferus, dan *elongated* spermatid mengalami degenerasi.

Hasil penelitian Hasanah (2009) melaporkan bahwa ekstrak daun pegagan dapat menurunkan sel spermatogenik yang meliputi sel spermatogonia dan sel spermatosit. Hal tersebut sesuai dengan yang diungkapkan oleh Satriyasa (2008), bahwa salah satu kemungkinan penurunan jumlah sel spermatid adalah adanya gangguan dalam proses meiosis. Kemungkinan yang lain disebabkan pada proses spermiogenesis awal telah terjadi gangguan, sehingga proses spermatogenesis berikutnya juga akan mengalami gangguan.

Penurunan jumlah sel spermatid setelah pemberian ekstrak daun pegagan juga dapat diakibatkan oleh terganggunya fungsi dari sel Sertoli dan sel Leydig. Terganggunya fungsi sel Sertoli menyebabkan sekresi *androgen binding protein* (ABP), suplai nutrisi, *growth factors*, laktat, dan transferin juga terganggu, sehingga mengakibatkan proses spermatogenesis akan terganggu, karena zat tersebut sangat dibutuhkan dalam proses spermatogenesis (Lohiya *et al.*, 2002). Selain itu, hilangnya fungsi sel Leydig menyebabkan sekresi hormon testosteron menjadi rendah, sehingga proses spermiogenesis menjadi terganggu (Donnel *et al.*, 1996).

Senyawa aktif tanin diduga berperan dalam menurunkan jumlah sel spermatid. Temuan tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut sesuai pendapat Herdiningrat (2002), senyawa antifertilitas dari tumbuhan obat bekerja dengan dua cara, yaitu melalui efek sitotoksik dan melalui efek hormonal yang menghambat laju metabolisme sel spermiogenesis dengan cara mengganggu keseimbangan sistem hormon. Tanin pada daun pegagan diduga bekerja sebagai senyawa antifertilitas melalui efek hormonal yang mirip dengan tanin pada buah manggis muda. Mekanisme senyawa aktif tersebut sesuai dengan

pendapat Robinson (2003) yang menyatakan bahwa tanin pada kulit kayu durian digunakan sebagai bahan baku untuk sintesis hormon steroid. Tanin pada daun pegagan mempunyai struktur kimia mirip steroid. Steroid merupakan struktur dasar dari hormon testosteron. Mekanisme kerja senyawa aktif masuk melalui biosintesis steroid terutama testosteron sehingga akan dihasilkan bahan yang strukturnya mirip testosteron (Nurliani *et al.* yang disitasi Susetyarini, 2011). Akibatnya, testosteron mempunyai efek umpan balik negatif pada kelenjar hipofisis anterior, sebagai penguat pada umpan balik hipofisis anterior terhadap hipotalamus. Umpan balik ini secara khusus diduga menghambat sintesis dan sekresi *luteinizing hormone* (LH) dan akan menurunkan sekresi testosteron (Weinbauer *et al.* yang disitasi Susetyarini, 2011).

Menurut Ganong (1983), sekresi testosteron dipengaruhi oleh hormon LH, dengan mekanisme hormon LH merangsang sel Leydig melalui peningkatan pembentukan siklus *adenosine monophosphate* (AMP). Siklik AMP meningkatkan pembentukan kolesterol dari ester kolesterol dan perubahan kolesterol menjadi pregnenolon melalui pengaktifan protein kinase. Protein kinase terhambat karena hadirnya senyawa flavonoid sehingga menyebabkan hormon testosteron dan proses spermatogenesis terganggu.

Penurunan *follicle stimulating hormone* (FSH) menyebabkan perubahan struktur sitoskeletal sel Sertoli, sehingga mengurangi kemampuan dalam mengikat spermatid, sedangkan pada hormon testosteron akan menyebabkan penurunan daya adhesi antara sel spermatid dengan sel Sertoli yang menyebabkan sel spermatid ke dalam tubulus seminiferus. FSH juga membantu pematangan spermatid menjadi spermatozoa selama proses spermatogenesis. Penurunan FSH dan testosteron akan menyebabkan sintesis protein untuk spermatid terganggu yang akhirnya menyebabkan degenerasi sel spermatid (Satriyasa, 2008).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dapat mengurangi laju perkembangan sel spermatid.

DAFTAR PUSTAKA

- Chuthbert, A.W. and P.Y.D. Wong. 1986. Elektrogenic anion secretion in cultured rat epididymal epithelium. *Physio.* 78:335-345.
- Courtens, J.L. and L. PiÖen. 1999. Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular Infusion of lactate. *Biol. Reproduct.* 61:154-161.
- Donnel, L.O., R.L. McLahlan, N.G. Wreford, D.M. de Kretser, and D.M. Robertson. 1996. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* (55):895-900.
- Dreef, H.C., V.E. Eric, and P.C.T. Eveline. 2007. Spermatogenesis in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): A practical guide for routine morphological staging. *Toxicologic Pathol.* 35:395-404.
- Fawcett, D.W. 2002. **Buku Ajar Histologi.** EGC, Jakarta.

- Ganong, M.D. dan F. Wiliam. 1983. **Fisiologi Kedokteran**. (Diterjemahkan Dharma, A). EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In **Reproduction in Farm Animals**. Hafez, B. and E.S.E. Hafez (Eds.). 7th ed. South Carolina, Baltimore.
- Grootegoed, J.A., R. Jansen, and H.J Molen. 1984. The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. **Biochem. Biophys Acta** 26:767:248-256.
- Hasanah, I.W. 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*). **Skripsi**. Jurusan Biologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Herdiningrat, S. 2002. Efek pemberian infus buah manggis muda (*Garcinia mangostana* Linn) terhadap spermatozoa mencit (*Mus musculus*). **Majalah Andrologi Indonesia**. 10:130.
- Kiernan, J.A. 1990. **Histological & Histochemical Methods: Theory & Practice**. 2nd ed. Pergamon, England.
- Kumar, V. and W. Gupta. 2006. **Asiatic Centella**. Provital Group.
- Lohiya, N.K., B. Manivannan, P.K Mishra, N. Pathak, S. Sriram, S.S. Bhande, and S. Panerdoss. 2002. Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces longterm reversible azoospermia in langur monkey. **Asian J. Androl.** 3(1):17-26.
- Malini, G., G. Gopal, and B.S. Setty. 1998. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. **European J. Endocrinol.** 138:322-327.
- Noor, M.M. dan N.M. Ali. 2004. Kesan in vivo ekstrak daun *Centella asiatica* ke atas histologi testis dan kualiti sperma mencit. **Sains Malaysiana**. 33(2):97-103.
- Robinson, T. 2003. **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**. (Diterjemahkan Padmawinata). Penerbit ITB, Bandung.
- Satriyasa, B.K. 2008. **Fraksi Heksan Ekstrak Biji Pepaya Muda Dapat Menghambat Proses Spermatogenesis Mencit Jantan Lebih Besar daripada Fraksi Metanol Ekstrak Biji Pepaya Muda**. Departement of Pharmacology, Udayana University, Bali.
- Susetyarini, E. 2011. Aktivitas dan Keamanan Senyawa Aktif Daun Beluntas sebagai Antifertilitas serta Pemanfaatannya sebagai Buku Antifertilitas. **Disertasi**. Program Pascasarjana UM. Malang.
- Toelihere, M.R. 1993. **Fisiologi Reproduksi pada Ternak**. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Wahyuni, S. 2012. Karakterisasi reproduksi muncak, *Muntiacus muntjak muntjak* jantan: kajian anatomi, profil metabolit testosteron, dan spermatogenesis selama periode pertumbuhan ranggah, **J. Ked. Hewan**. 13(3):31-35.