

## Aktivitas Formulasi Biji Jarak Pagar dan Pare terhadap Spermatogenesis pada Tikus Wistar

**Penulis** Lilis Nurhadijah<sup>1\*</sup>, Alfa A Perdana<sup>1</sup>, Widyawati<sup>1</sup>, Ferian A Setiyoko<sup>2</sup>, Baiq NM Utami<sup>3</sup>, Tri Isyani Tungga Dewi<sup>4</sup>, Irma H Suparto<sup>1,5</sup>

**Afiliasi**  
<sup>1</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor  
<sup>2</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor  
<sup>3</sup>Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor  
<sup>4</sup>Rumah Sakit Hewan, Institut Pertanian Bogor  
<sup>5</sup>Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor

### Kata Kunci

- Biji jarak pagar
- Pare
- Kualitas spermatozoa
- Testis

**Diterima** 20 Desember 2017

**Direvisi** 2 Februari 2018

**Disetujui** 9 Maret 2018

### \* Penulis Koresponding

Lilis Nurhadijah  
 Kampus IPB Dramaga  
 lilis@apps.ipb.ac.id

### ABSTRAK

Bahan alam yang dapat menghambat spermatogenesis merupakan suatu alternatif untuk kontrasepsi pria. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi formulasi optimum berbasis biji jarak pagar dan buah pare yang dapat menghambat spermatogenesis. Bahan sampel dimaserasi alkohol 70% untuk memperoleh ekstrak kasar. Ekstrak diujikan pada tikus Wistar jantan dewasa sebanyak 30 ekor dan dibagi menjadi enam kelompok secara acak (n=5 ekor). Kelompok I sebagai kontrol memperoleh pelarut akuades; kelompok II dan III secara berurutan memperoleh ekstrak biji jarak dan pare dengan dosis 50 mg/kgBB. Tiga kelompok lainnya, yaitu IV, V, dan VI memperoleh formulasi gabungan dengan rasio ekstrak biji jarak pagar dan pare 1:3, 3:1 serta 1:1, secara berurutan. Perlakuan diberikan per oral satu hari sekali selama 48 hari sesuai dengan siklus spermatogenesis. Pada akhir perlakuan, pemeriksaan sperma untuk konsentrasi dan kualitasnya serta bobot testis. Hasil uji rendemen ekstrak biji jarak pagar dan buah pare secara berurutan sebesar 6.11 % dan 3.32 %. Senyawa fitokimia yang terdapat pada ekstrak pare dan biji jarak pagar antara lain, alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid, dan steroid. Efek ekstrak terhadap bobot testis dan konsentrasi sperma tidak ada perbedaan yang nyata antar kelompok (ANOVA P >0.05) sedangkan untuk kualitas motilitas sperma ada kecenderungan menurun pada formulasi ekstrak biji jarak dan buah pare (1:3).

### PENDAHULUAN

Program keluarga berencana (KB) diselenggarakan pemerintah bertujuan mengendalikan laju pertumbuhan penduduk, yang nantinya diharapkan dapat berkontribusi dalam peningkatan sumber daya manusia. Berdasarkan sensus penduduk pada 30 Juni 2016, penduduk Indonesia berjumlah 257.912.349 jiwa dengan rata-rata pertumbuhan 1.38 persen maka diprediksikan jumlah penduduk Indonesia pada tahun 2045 mendatang menjadi 450 juta, jika pelaksanaan program KB kurang memberikan hasil yang optimal. Keberhasilan program ini tergantung pada partisipasi kedua pihak,



baik laki-laki maupun perempuan. Tetapi, selama ini partisipasi laki-laki dalam program ini masih relatif rendah bila dibandingkan dengan perempuan. Berdasarkan data BKKBN menunjukkan peningkatan partisipasi pada tahun 2005 dari 2.7% menjadi 6.5% pada tahun 2015. Rendahnya partisipasi ini disebabkan keterbatasan metode kontrasepsi yang dapat digunakan laki-laki. Sampai saat ini metode yang dapat digunakan hanyalah vasektomi, kondom, dan penyuntikan hormon. Namun hasilnya belum sepenuhnya diterima masyarakat dan belum 100% dapat mencegah kehamilan.

Salah satu upaya yang dapat digunakan dalam meningkatkan partisipasi laki-laki dalam mengikuti program KB adalah dengan meningkatkan sarana dan metode kontrasepsi. Alat kontrasepsi yang ideal dapat mencegah fertilisasi, aman, reversibel, bekerja cepat, toksisitas rendah, tanpa efek samping, tidak mempengaruhi potensi seks, dan libido. Inovasi yang sedang dikembangkan adalah penggunaan tanaman obat alami Indonesia. Saat ini 75% masyarakat di dunia sangat mengandalkan tanaman obat (Jamal *et al.* 2011). Menurut Tadjuddin (1984), keuntungan memanfaatkan tanaman antara lain, toksisitas rendah, mudah diperoleh, murah, dan sedikit menimbulkan efek samping.

Buah pare dan biji jarak pagar mempunyai potensi sebagai herbal antifertilitas. Potensi ini disebabkan terdapat senyawa yang bersifat antifertilitas pada kedua tanaman tersebut, yaitu *cucurbitacin* (kurkubitasin) pada tanaman pare dan *jatrophine* (jatrofin) pada biji jarak pagar.. Menurut Ekwere *et al.* (2011), biji jarak merupakan obat tradisional yang sering digunakan untuk kontrasepsi wanita di Rukuba, Nigeria Tengah. Di samping itu, buah dari tanaman jarak pagar juga mampu menurunkan motilitas dan jumlah sperma serta memiliki aktivitas sebagai abortivum (Shweta *et al.* 2011). Kukurbitasin (momordikosida K dan L) dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan sel (West *et al.* 1971). Aktivitas antifertilitas dibuktikan Dixit *et al.* (1978) bahwa efek ekstrak buah pare menekan fungsi testis anjing percobaan dalam memproduksi spermatozoa. Pemberian ekstrak buah pare selama 60 hari menyebabkan tidak ada spermatozoa pada tubulus seminiferus dan pada 75% tubulus seminiferus tidak dijumpai adanya spermatid.

Berdasarkan latar belakang di atas maka pada penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dan memperoleh formulasi optimum kombinasi ekstrak ampas biji jarak pagar dan ekstrak pare sebagai antispermatogenesis pada tikus *Wistar norvegicus* jantan dewasa. Hasil penelitian ini diharapkan memberi informasi potensi formulasi bahan alam sebagai sediaan alternatif kontrasepsi pria.

## METODE

### Pembuatan Ekstrak Biji Jarak Pagar dan Buah Pare

Biji jarak pagar (Nganjuk, Jawa Timur) dan buah pare (Bogor, Jawa Barat) dikeringkan, dirajang dan diayak dengan ayakan mesh 40 sehingga diperoleh serbuk simplisia. Ekstraksi kedua simplisia masing-masing dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:3. Pelarut diganti setiap hari sekali sebanyak 3 kali. Hasil maserasi disaring sehingga diperoleh filtrat dan dipekatkan menggunakan penguap putar hingga ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan uji fitokimia dan uji organoleptik.

### Pengujian Ekstrak pada Hewan Coba Tikus

Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih (*Wistar norvegicus*) jantan dewasa berumur 9 minggu dengan kisaran bobot badan 200 g. Penelitian merupakan penelitian eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus dibagi secara acak berdasarkan bobot badannya ke dalam 6 kelompok perlakuan ( $n = 5$  ekor). Kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (akuades), kelompok ekstrak biji jarak pagar 50 mg/KgBB, kelompok ekstrak pare 50 mg/KgBB, Kelompok kombinasi ekstrak biji jarak pagar : pare (3:1), Kelompok ekstrak biji jarak pagar : pare (1:3), dan kelompok ekstrak biji jarak pagar : pare (1:1). Setiap pagi hewan diberi sediaan secara oral (sonde) selama 48 hari dengan dosis sesuai perkembangan bobot badan tikus setiap minggunya.

Seluruh prosedur pada hewan telah disetujui Komisi Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan IPB (059/KEH/SKE/IV/2017). Sebelum penelitian dilakukan, hewan diadaptasikan selama 2 minggu dan memperoleh minum secara *ad libitum* serta pakan komersial standar (*Turbo Feed T.79-4*) sebanyak 5-10 g/kg/ekor. Akhir perlakuan setelah 48 hari, kemudian hewan dibius menggunakan ketamin HCl (40 mg/kg BB) dan xylazine (5 mg/kgBB).



### Koleksi Sperma dan Penghitungan Konsentrasi Sperma (Solihati *et al.* 2013)

Hewan setelah dibius dan dietanasia diambil testisnya. Testis digunakan untuk dilakukan uji hispatologi. Bagian kauda epididimis (kanan) dipotong 1 cm untuk dikeluarkan cairannya sebanyak 20 µl dan dimasukkan ke dalam tabung mikro eppendorf yang berisi NaCl fisiologis 980 µl dan dibiarkan 1-2 menit. Selanjutnya campuran dihomogenkan lalu ditetaskan pada kamar hitung Neubauer dan dilakukan penghitungan di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x. Penghitungan spermatozoa dilakukan terhadap lima kamar dari sebanyak 25 kamar hitung yang ada dengan arah diagonal (sudut kanan atas dan bawah, sudut kiri atas dan bawah, serta tengah).

$$\text{Konsentrasi Spermatozoa} = n \times 10.000 \times fp \times \frac{25}{k} \times v \text{ NaCl}$$

### Evaluasi Spermatozoa Hidup (WHO 1999)

Evaluasi spermatozoa yang hidup dilakukan berdasarkan Manual Laboratorium WHO (1999). Satu tetes eosin 2% ditetaskan pada ujung gelas obyek kemudian ditambahkan 10 µl semen tikus, dihomogenkan dan selanjutnya dibuat preparat ulas. Preparat ulas lalu difiksasi di atas nyala api. Spermatozoa yang hidup dievaluasi di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x dalam 10 lapangan pandang untuk memperoleh 200 spermatozoa. Jumlah spermatozoa yang hidup dinyatakan dalam persen. Untuk penentuan persentase spermatozoa yang hidup digunakan rumus:

$$\text{Persentase spermatozoa (\%)} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Hidup}}{\text{Jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

### Analisis Statistik

Data bobot badan, bobot testis, dan konsentrasi sperma dianalisis secara statistik dengan menggunakan program pengolah data Minitab 16 yang meliputi uji normalitas, uji homogenitas, dan uji parametrik (*one way- ANOVA*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Organoleptik dan Fitokimia Ekstrak

Serbuk simplisa sebanyak 395.88g biji jarak pagar dan 105.85g pare menghasilkan rendemen 6.11% dan 3.32%, secara berurutan. Hasil organoleptik ekstrak biji jarak pagar dan buah pare ditampilkan pada Tabel 1. Hasil analisis fitokimia kedua ekstrak sampel dilakukan

secara kualitatif (Harborne 2006). Fitokimia dari kedua sampel ekstrak menunjukkan semua positif terhadap saponin, tanin, alkaloid, flavonoid, steroid, dan triterpenoid.

**Tabel 1** Hasil uji organoleptik ekstrak biji jarak pagar dan buah pare

Ekstrak	Uji organoleptik		
	Bentuk	Warna	Bau
Biji jarak pagar	Kental	Coklat	Khas
Buah pare	Serbuk	Hijau	Khas

Ekstrak yang diperoleh menggunakan ethanol 70% menunjukkan semua golongan metabolit sekunder dapat terekstrak. Hal ini dikarenakan etanol memiliki dua gugus yang berbeda sifat kepolarannya, yaitu gugus hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat nonpolar. Kedua gugus ini akan menyebabkan senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran yang berbeda dapat terekstrak dalam etanol (Agustina 2014). Hasil yang diperoleh sesuai hasil Arininggar (2008) dan Arini (2012) terhadap ekstrak pare dan biji jarak pagar. Perbedaan metabolit sekunder yang terekstrak (Pratama *et al.* 2015; Hartini 2011) dapat disebabkan faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik merupakan faktor yang berasal dari proses fisiologis yang berlangsung di dalam tubuh tumbuhan yang meliputi sifat genetiknya, sedangkan faktor ekstrinsik berasal dari pengaruh lingkungan seperti faktor tanah serta faktor iklim (Agustina 2014).

### Bobot Badan Tikus

Akhir perlakuan terdapat jumlah hewan 26 ekor, empat ekor mati disebabkan bukan karena pemberian sampel ekstrak. Selama pemberian ekstrak, dilakukan pengamatan kondisi umum dan penimbangan bobot badan setiap minggu. Rerata bobot badan sebelum dan sesudah perlakuan selama 48 hari ditampilkan pada Tabel 2.

Bobot badan sebelum dan sesudah akhir perlakuan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) menunjukkan peningkatan yang nyata pada akhir perlakuan. Akan tetapi tidak berbeda nyata antar kelompok ( $P > 0.05$ ). Berdasarkan data yang diperoleh, pemberian ekstrak secara oral selama satu siklus spermatogenesis tidak mempengaruhi nafsu makan dan pertumbuhan normal dari seluruh hewan coba yang ditandai dengan peningkatan bobot secara stabil. Hal ini juga



**Tabel 2** Rerata bobot badan tikus awal dan akhir perlakuan

Kelompok	Bobot badan (g)	
	Awal perlakuan	Akhir perlakuan
Kontrol	68.93 ± 19.89	140.40 ± 20.75
Ekstrak biji jarak pagar	88.06 ± 14.60	175.75 ± 32.44
Ekstrak buah pare	92.84 ± 13.20	155.00 ± 21.44
Ekstrak jarak pagar:pare = 3:1	97.76 ± 16.75	167.40 ± 26.78
Ekstrak jarak pagar:pare = 1:3	95.62 ± 17.66	164.60 ± 29.11
Ekstrak jarak pagar:pare = 1:1	103.93 ± 25.06	203.00 ± 35.88

**Tabel 3** Rerata bobot testis dan rasio bobot badan/bobot testis tikus

Kelompok	Bobot Testis (g) ±SD (P>0.05)	Rasio Bobot Badan:Bobot Testis (P>0.05)
Kontrol	1.17 ± 0.24	0.0701
Ekstrak biji jarak pagar	1.48 ± 0.33	0.0097
Ekstrak buah pare	1.09 ± 0.13	0.0079
Ekstrak jarak pagar:pare = 3:1	0.93 ± 0.36	0.0066
Ekstrak jarak pagar:pare = 1:3	1.16 ± 0.24	0.0081
Ekstrak jarak pagar:pare = 1:1	1.29 ± 0.11	0.0077

SD: Standar deviasi

dilaporkan oleh Wina *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa tikus yang diberi pakan jarak pagar akan mengalami penambahan bobot hidup yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan tikus kontrol yang tidak mengkonsumsi jarak pagar.

### **Bobot Testis dan Rasio Bobot Badan/Bobot Testis**

Setelah perlakuan selama 48 hari, dikoleksi testis kiri dan kanan serta dihitung rerata dari bobot testis dan rasio dari bobot badan per bobot testis (Tabel 3). Bobot testis pada seluruh kelompok tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P>0.05$ ). Demikian pula setelah diperhitungkan rasio bobot badan terhadap bobot testis juga tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P>0.05$ ). Efek pemberian kedua ekstrak dievaluasi berdasarkan respon dari bobot testis yang bila ada gangguan dapat hiperproliferasi (membesar) ataupun atrofi. Pengurangan jumlah sel menyebabkan atrofi dapat diakibatkan ketidakseimbangan proliferasi dan kematian sel dalam jangka waktu tertentu. Pada hewan jantan, *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) disekresikan dari hipotalamus untuk menstimulasi pelepasan *lutensizing hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dari pituitari anterior. LH and FSH mengatur aktivitas testis. LH merangsang sel-sel Leydig untuk memproduksi testosteron. FSH akan

menstimulasi sel-sel Sertoli untuk proses pembentukan sel-sel germinal pada spermatogenesis. Penurunan FSH dan kadar testosteron inilah yang juga diduga menurunkan berat testis. Sehingga dengan berkurangnya bobot testis dapat menyebabkan gangguan dalam proses spermatogenesis dan kualitas sperma yang dihasilkan (Cholifah *et al.* 2014).

### **Pengukuran Konsentrasi Spermatozoa**

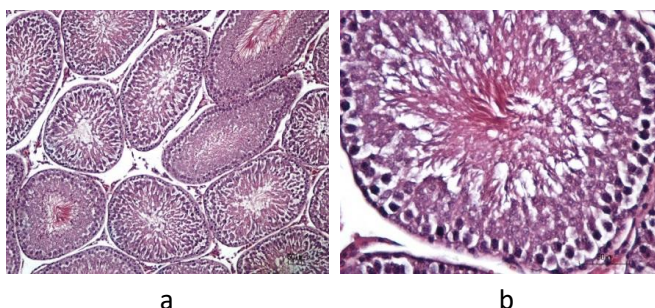
Konsentrasi dan kualitas spermatozoa dinilai pada akhir perlakuan. Kualitas spermatozoa dinilai berdasarkan pergerakannya dari diam tak bergerak (-), ada pergerakan (+1), bergerak cepat (+2), dan bergerak sangat cepat (+3) (Tabel 4). Berdasarkan Tabel 4, masing masing kelompok yang diberi perlakuan menghasilkan motilitas sperma yang berbeda, proses ini dilihat dengan menggunakan mikroskop 40x. Sperma dikatakan motil apabila dapat bergerak dengan progresif dan sedangkan sperma yang tidak bergerak atau hanya bergerak berputar ditempat dihitung sebagai sperma yang mati (Rough 2003). Hasil menunjukkan bahwa rerata motilitas paling rendah terjadi pada kelompok 2 dan 4 dengan pergerakan yang paling lemah. Hasil tersebut berkorelasi dengan hasil pada Tabel 4 bahwa ekstrak pada hewan yang memperoleh formulasi ekstrak 1:3 menghasilkan



konsentrasi spermatozoa yang paling rendah diantara kelompok lainnya.

Jumlah spermatozoa yang dihasilkan tergantung pada proses yang terjadi selama proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferus. Bila spermatogenesis berlangsung normal maka akan menghasilkan jumlah sperma yang normal juga. Sebaliknya jika selama proses spermatogenesis terdapat gangguan, maka perkembangan sel spermatogonium akan mempengaruhi jumlah spermatozoa yang terbentuk.

Uji hispatologi dilakukan pada testis tikus yang mendapat perlakuan biji jarak pagar:pare (1:3) (Gambar 1). Karena pada perlakuan tersebut, tikus menghasilkan sperma yang cenderung sedikit dan menghasilkan motilitas yang rendah. Gerak sperma pada perlakuan tersebut tergolong rendah diantara perlakuan yang lain. Hasil Uji hispatologi menunjukkan bahwa tidak ada kelainan pada sel testis tikus yang mendapat perlakuan biji jarak pagar:pare (1:3) dan tidak ada pengaruh nyata pemberian perlakuan terhadap sel-sel pada testis.



**Gambar 1** Hasil uji hispatologi testis hewan perlakuan biji jarak pagar: pare (1:3) perbesaran 100× (a) dan 400× (b)

## SIMPULAN

Formulasi ekstrak biji jarak pagar dan buah pare pada konsentrasi 50 mg/KgBB belum menunjukkan efek antifertilitas terhadap jumlah atau konsentrasi sperma, akan tetapi ada kecenderungan menurunkan motilitas atau pergerakan sperma. Hal ini menunjukkan suatu potensi sebagai antifertilitas dengan melakukan eksplorasi konsentrasi ekstrak yang digunakan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan Penulis kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Kemristekdikti) atas hibah penelitiannya. Ucapan

terima kasih kepada Yuri Bambang, Amd yang telah membantu dalam perawatan dan perlakuan pada hewan coba.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina A. 2014. Konservasi tabat barito di taman nasional gunung gede pangrango ditinjau dari karakteristik habitat mikro dan kandungan bioaktif daunnya [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Arini WD. 2012. Uji Antifertilitas Etkstrak Etanol 70% Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Pada Tikus Jantan Galur *Sprague Dawley* Secara *IN VIVO* [Skripsi]. Jakarta (ID): UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Arininggar AG. 2008. Uji aktivitas ovisidal terhadap telur *ascaris suum* dan penentuan parameter standar ekstrak etanol daun pare (*momordica charantia* l). [Skripsi]. Jember (ID): Universitas Jember.
- Cholifah S, Arsyad, Salni. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Pare(*Momordica charantia*,L) Terhadap Struktur Histologi Testis dan Epididimis Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*) Sprague Dawley. *Majalah Kedokteran Sriwijaya*. 46(2):149-157
- Christijanti W. 2009. Penurunan jumlah dan motilitas spermatozoa setelah pemberian ekstrak biji pepaya (Kajian Potensi Biji Papaya sebagai bahan kontrasepsi Alternatif). *Biosaintifika* :19-26.
- Dixit VP, Kimna P, Bhargava SK. 1978. Effects of *Momordica charantia* L. Fruit extract on the Testicular Function of Dog. *Journal of Medicinal Plants Research*. 34:280.
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (alih bahasa: Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro)*. Bandung (ID): ITB Press.
- Hartini. 2011. Pengaruh Dekok Daun Jambu Biji Merah (*Psidium guajava*.L) Terhadap Jumlah Kecepatan dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*). [Tesis]. Padang (ID): Universitas Andalas.
- Kime DE, Van Look KJM, Mc Allister BG, Huykens G, Rurangwa E, Ollevier F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* : 425-433.
- Jamal P, Karim IA, Erlina A, Raus RA, Hashim YZ. 2011. Phytochemical screening for antibacterial activity



- of potential malaysian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 10(81):18795-18799.
- Pratama RD, Yuliani, Trimulyono G. 2015. Efektivitas ekstrak daun dan biji jarak pagar (*Jatropha curcas*) sebagai antibakteri *Xanthomonas campestris* penyebab penyakit busuk hitam pada tanaman kubis. *Lentera Bio* 4 (1): 112–118. ISSN: 2252-3979.
- Soehadi K dan Arsyad KM. 1983. *Analisis Sperma*. Surabaya (ID): Airlangga University Press.
- Subahar TSS. 2004. *Khasiat dan Manfaat Pare: Si Pahit Pembasmi Penyakit*. Jakarta (ID): Agromedia Pustaka.
- Shweta Y, Sinha RP, Tyagi MB, Ashok K. 2011. Cyanobacterial secondary metabolites. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2(1): (b) 144-167.
- Tadjuddin MK. 1984. Tujuan kontrasepsi pada pria; oligozoospermia, azoospermia, astenoospermia. *MKI*. 15:693.
- West ME, Sidrak GH, Street SPW. 1971. The Anti-Growth Properties of Extracts from *Momordica charantia* L. *The West Indian Medical Journal*. 20: 25.
- Wina E, Susana IWR, Pasaribu T. 2008. Pemanfaatan Bungkil Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) dan Kendalanya Sebagai Bahan Pakan Ternak. *Wartazoa*. 18(1): 1-8.
- World Health Organization. 1999. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction*. 4th ed. England (UK): Cambridge University Press.

