

PENGARUH EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* (L) Urban) TERHADAP FERTILITAS TIKUS PUTIH BETINA (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR

Nelly Mariyam

Program Studi Ilmu Bio Medik Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya Palembang

Email: nellymariyam88@gmail.com

Abstract: The Effect of *Centella asiatica* Leaf Extract on Fertility of White Rats (*Rattus norvegicus*) Female Wistar Strain. Pegagan is a medicinal plant that is widely used as a traditional medicine. Pegagan contains triterpenoids amount of active ingredient group allegedly capable of affecting the female reproductive organs. This study aims to determine the effect of *Centella asiatica* leaf extract on fertility of white rats (*Rattus norvegicus*) female Wistar strain, which includes the percentage of implantation, the percentage loss of gestation and post-implantation mortality percentage. Study uses a completely randomized design to female rats weighing 200-240 grams. The sample consisted of 30 rats were divided 5 groups: control group, treatment group given the extract of *Centella asiatica* leaf. Analysis of the data using One way ANOVA followed by Post Hoc Test. The results showed Pegagan leaf extract 125 mg dose may decrease the percentage of implantation, increasing the percentage loss pascaimplantasi gestation and increase mortality, but not significantly different from the control, while a dose of 200 mg, 275 mg and 350 mg can reduce the percentage of implantation, gestation increases the loss and increase mortality post-implantasi. From the results of this study concluded leaf extract pegagan (*Centella asiatica* (L) urban) may decrease the fertility of white rats (*Rattus norvegicus*) female.

Keywords: Leaf extract pegagan, Fertility of white rats

Abstrak: Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella Asiatica* (L) Urban) terhadap Fertilitas Tikus Putih Betina (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar. Pegagan merupakan salah satu tanaman obat yang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Pegagan mengandung sejumlah bahan aktif golongan *triterpenoid* yang diduga mampu mempengaruhi organ-organ reproduksi betina. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun pegagan terhadap fertilitas tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur wistar, yang meliputi persentase implantasi, persentase kehilangan gestasi dan persentase kematian pasca implantasi. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap terhadap tikus betina dengan berat 200-240 gram. Sampel terdiri dari 30 ekor tikus yang dibagi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan diberikan ekstrak daun pegagan. Analisis data menggunakan *One way Anova* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*. Hasil penelitian memperlihatkan pemberian ekstrak daun pegagan dosis 125 mg dapat menurunkan persentase implantasi, meningkatkan persentase kehilangan gestasi dan meningkatkan kematian pasca implantasi namun tidak berbeda nyata dengan kontrol sedangkan dosis 200 mg, 275 mg dan 350 mg dapat menurunkan persentase implantasi, meningkatkan kehilangan gestasi dan meningkatkan kematian pascaimplantasi. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L) urban) dapat menurunkan fertilitas tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina.

Kata kunci : Ekstrak daun pegagan, Fertilitas tikus putih

Kepadatan penduduk di Indonesia merupakan salah satu permasalahan yang dihadapi oleh pemerintah yang sampai sekarang belum dapat diatasi, hal ini disebabkan karena terjadi peningkatan jumlah penduduk setiap tahunnya. Peningkatan jumlah penduduk semakin lama menunjukkan permasalahan yang mengkhawatirkan, karena tidak diimbangnya dengan peningkatan kesejahteraan (Hasanah, 2006). Oleh karena itu pemerintah menjadikan program Keluarga Berencana (KB) sebagai

bagian dari pembangunan nasional. Peningkatan pelayanan Program Keluarga Berencana (KB) merupakan salah satu cara untuk merencanakan dan mengatur jarak kelahiran. Dalam usaha memberi pelayanan kepada masyarakat berbagai macam metode kontrasepsi telah ditawarkan, akan tetapi sampai sekarang metode kontrasepsi yang ideal belum ada.

Kontrasepsi yang ideal harus memenuhi beberapa syarat, yaitu dapat dipercaya, tidak menimbulkan efek yang mengganggu kesehatan,

daya kerjanya dapat diatur menurut kebutuhan (*reversibel*), tidak dapat menimbulkan gangguan sewaktu *coitus*, tidak memerlukan motivasi terus menerus, mudah pelaksanaannya, murah harganya sehingga dapat dijangkau oleh seluruh lapisan masyarakat (Everentt, 1997).

Untuk saat sekarang masyarakat lebih memilih alternatif menggunakan obat tradisional karena dianggap relatif lebih murah (dapat terjangkau oleh semua lapisan masyarakat), efisien dan lebih aman dari efek samping dibandingkan dengan obat sintetik.

Salah satu tanaman yang banyak digunakan sebagai obat tradisional tersebut adalah pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban). Pegagan (*Centella asiatica* (Linn) Urban) atau *Hydrocotyle* atau *Pasequinus*, *Rumph*, telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional baik dalam bentuk bahan segar, kering maupun dalam bentuk ramuan. Tanaman ini telah terbukti memiliki efek farmakologi dari beberapa penelitian. Di Australia pegagan telah banyak dimanfaatkan sebagai obat untuk penyembuhan luka, radang, reumatik, asma, wasir, tuberculosis, lepra, disentri, demam, dan penambah selera makan. Selain itu, pegagan juga mudah didapat yang banyak ditemukan di daerah perkebunan, ladang, tepi jalan, pematangan sawah ataupun di ladang yang agak basah (Besung, 2009). Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) mampu mempengaruhi system saraf pusat, meningkatkan daya rangsang saraf otak serta dapat meningkatkan kemampuan kognitif tikus dengan mempengaruhi modulasi neurotransmitter monoamin pada hipokampus tikus (Annisa, 2006).

Pada penelitian Fitriyah (2009) ekstrak daun pegagan pada dosis rendah 75 mg/kg BB dapat meningkatkan jumlah folikel pada ovarium betina, sedangkan pada dosis tinggi 100 mg/kg BB dan 125 mg/kg BB pegagan dapat menyebabkan folikel-folikel atresia pada ovarium mencit betina. Hal ini nampaknya yang mendasari berbagai penelitian untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) terhadap fertilitas pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur Wistar.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium (*Experimental Research*) dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dilaksanakan bulan Maret 2014. Tempat di Laboratorium Bersama Pascasarjana Unsri, Laboratorium Bagian Biologi Kedokteran dan di *Animal House*

Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang. Populasi hewan uji yang digunakan adalah tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur *wistar* dan tikus jantan galur *wistar* (30:10).

Sampel, berasal dari populasi yang sudah dihomogenkan yaitu umur 3-4 bulan dengan berat badan tikus sekitar 200-240 gram. Jumlah ulangan untuk setiap perlakuan adalah 5 kali ulangan dengan jumlah kelompok percobaan adalah 5 sehingga didapatkan jumlah sampel pada penelitian ini 25, untuk mengantisipasi kejadian *drop out*, jumlah sampel ditambahkan 5 sampel dan total sampel yang diperlukan sebanyak 30 sampel.

Tujuan penelitian, mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) terhadap fertilitas pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur Wistar.

Analisis data menggunakan system komputerisasi, dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Analisis data dilakukan sebagai berikut: 1) analisis deskriptif disajikan dalam bentuk tabel, grafik, dan narasi, 2) *One Way Anova* untuk mengetahui bentuk dan keeratan hubungan antara parameter-parameter fertilitas dengan berbagai dosis. Selanjutnya dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* (Walpole, 1995).

HASIL

Tahapan penelitian meliputi: proses ekstraksi daun pegagan menggunakan metode maserasi dilakukan di Laboratorium Bersama Pascasarjana Unsri. Perlakuan dan pembedahan dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Unsri Palembang. Ekstrak daun pegagan yang diberikan pada tikus betina selama 7 hari dimulai pada siklus proestrus akhir dan pada hari ke-16 kebuntingan tikus dibedah, diamati dan dihitung, jumlah implantasi, jumlah korpus luteum, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, dan jumlah embrio teresorpsi.

1. Ekstraksi Simplisia Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban)

Ekstraksi simplisia daun pegagan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Berdasarkan hasil ekstraksi simplisia daun pegagan sebanyak 1000 gram setelah dilakukan ekstraksi maka diperoleh berat ekstrak sebanyak 235 gram (23,5%). Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi merupakan proses pengekstraksian sederhana dengan cara merendam simplisia daun pegagan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3 liter

selama 24 jam diulangi sebanyak 3 kali, sehingga sampel menjadi lunak dan larut.

Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan prinsip kelarutan. Pelarut yang digunakan adalah etanol yang bersifat polar dengan prinsip kelarutannya adalah pelarut polar akan melarutkan senyawa polar.

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk melihat homogen atau tidaknya berat badan tikus yang diberi berbagai dosis ekstrak daun pegagan. Hasil uji homogenitas berat badan tikus dapat dilihat pada Tabel di bawah ini:

Tabel 1. Uji Homogenitas Berat Badan Tikus

Kelompok Perlakuan	n	\bar{x} BB tikus \pm SD	p value	\bar{x} kebuntingan BB \pm SD	p value
Kontrol	6	208,33 \pm 11,69	0,898	230,0 \pm 6,32	0,348
125 mg/gram BB	6	208,33 \pm 9,82		230,0 \pm 8,94	
200 mg/gram BB	6	213,33 \pm 12,11		231,6 \pm 7,52	
275 mg/gram BB	6	208,33 \pm 11,69		228,3 \pm 9,83	
350 mg/gram BB	6	213,33 \pm 13,66		228,3 \pm 9,83	

Hasil uji homogenitas menggunakan *Levene test* didapatkan rata-rata berat badan tikus sebelum perlakuan antar kelompok menunjukkan tidak ada perbedaan berat badan tikus antar kelompok perlakuan, nilai *p value* = 0,898 dengan nilai $\alpha = 0,05$ ($p > \alpha$). Hal ini menunjukkan bahwa berat badan tikus seluruh kelompok homogen.

3. Perbedaan Jumlah Korpus Luteum antar Kelompok Perlakuan

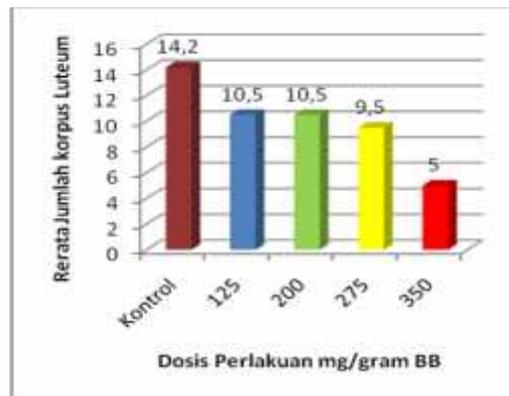
Rata-rata jumlah korpus luteum tikus pada hari ke-16 kebuntingan yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel di bawah ini:

Tabel 2. Perbedaan Jumlah Korpus Luteum antar Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	n	$\bar{x} \pm SD$	p value
Kontrol	6	14,20 \pm 1,92	
125 mg/gram BB	6	10,50 \pm 1,64	0,000
200 mg/gram BB	6	10,50 \pm 3,78	
275 mg/gram BB	6	9,50 \pm 2,73	
350 mg/gram BB	6	5,00 \pm 1,26	

Dari tabel di atas dapat dilihat pemberian ekstrak daun pegagan dapat mempengaruhi jumlah rata-rata korpus luteum antar kelompok perlakuan. Hasil uji *One Way Anova* di dapatkan nilai *p value* = 0,000 dengan nilai $\alpha = 0,05$ ($p < \alpha$)

hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan jumlah korpus luteum antar kelompok perlakuan.



Gambar 1. Histogram pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata jumlah korpus luteum

Gambar histogram 1 memperlihatkan hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata jumlah korpus luteum. Terjadi penurunan jumlah korpus luteum pada dosis perlakuan, jumlah terendah yaitu dosis 350 mg yaitu rerata 5% dan jumlah tertinggi pada dosis kontrol yaitu 14,2%.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok dilakukan uji lanjut dan didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 3. Hasil Uji Lanjut Post hoc-test (Bonferroni)

	Kontrol	125 mg	200 mg	275 mg	350 mg
Kontrol		0,204	0,204	0,043	0,000
125 mg	0,204		1,000	1,000	0,007
200 mg	0,204	1,000		1,000	0,007
275 mg	0,043	1,000	1,000		0,042
350 mg	0,000	0,007	0,007	0,042	

Dari hasil *Post hoc-test* diperoleh dosis ekstrak 125 mg dan 200 mg memberi efek yang tidak berbeda dengan kontrol. Pada dosis 275 mg dan dosis 350 mg memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan jumlah korpus luteum dan berbeda dengan kontrol.



Gambar 2. Korpus luteum pada kelompok kontrol

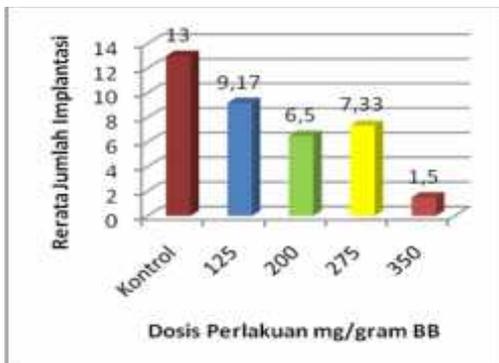
4. Perbedaan Jumlah Implantasi antar Kelompok Perlakuan

Rata-rata jumlah implantasi tikus pada hari ke-16 kebuntingan yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel di bawah ini:

Tabel 4. Perbedaan Jumlah Implantasi antar Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	n	$\bar{x} \pm SD$	<i>p</i> value
Kontrol	6	13,00 ± 1,41	0,000
125 mg/gram BB	6	9,17 ± 1,32	
200 mg/gram BB	6	6,50 ± 1,04	
275 mg/gram BB	6	7,33 ± 1,86	
350 mg/gram BB	6	1,50 ± 2,34	

Dari tabel 4 dapat dilihat pemberian ekstrak daun pegagan dapat mempengaruhi jumlah rata-rata implantasi antar kelompok perlakuan. Hasil uji *One Way Anova* di dapatkan nilai *p* value=0,000 dengan nilai =0,05 ($p <$) hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan jumlah implantasi antar kelompok perlakuan.



Gambar 3. Histogram pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata jumlah implantasi

Gambar histogram di atas memperlihatkan mengenai hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata jumlah implantasi. Terjadi penurunan jumlah implantasi pada dosis perlakuan, jumlah terendah yaitu dosis 350 mg yaitu rerata 1,50% dan jumlah tertinggi pada dosis kontrol yaitu 13,0%.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok dilakukan uji lanjut dan didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5. Hasil Uji Lanjut *Post hoc-test* (*Bonferroni*)

	Kontrol	125 mg	200 mg	275 mg	350 mg
Kontrol		0,009	0,000	0,000	0,000
125 mg	0,009		0,109	0,698	0,000
200 mg	0,000	0,109		1,000	0,000
275 mg	0,000	0,698	1,000		0,000
350 mg	0,000	0,000	0,000	0,000	

Hasil *Post hoc-test* diperoleh dosis ekstrak 125 mg, 200 mg, 275 mg dan dosis 350 mg memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan jumlah implantasi dan berbeda dengan kontrol.

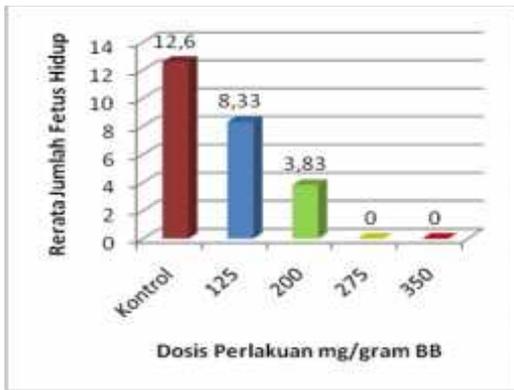
5. Perbedaan Jumlah Fetus Hidup antar Kelompok Perlakuan

Rata-rata jumlah fetus hidup tikus pada hari ke-16 kebuntingan yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel di bawah ini:

Tabel 6. Perbedaan Jumlah Fetus Hidup antar Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	n	$\bar{x} \pm SD$	<i>p</i> value
Kontrol	6	12,60 ± 1,34	0,000
125 mg/gram BB	6	8,33 ± 2,33	
200 mg/gram BB	6	3,83 ± 1,32	
275 mg/gram BB	6	0,00 ± 0,00	
350 mg/gram BB	6	0,00 ± 0,00	

Dari tabel di atas dapat dilihat pemberian ekstrak daun pegagan dapat mempengaruhi jumlah rata-rata fetus hidup antar kelompok perlakuan. Hasil uji *One Way Anova* di dapatkan nilai *p* value = 0,000 dengan nilai =0,05 ($p <$) hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan jumlah implantasi antar kelompok perlakuan.



Gambar 4. Histogram pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata jumlah fetus hidup

Grafik histogram 4 memperlihatkan mengenai hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata jumlah fetus hidup. Terjadi penurunan jumlah fetus hidup pada dosis perlakuan, jumlah terendah yaitu dosis 275 mg dan 350 mg yaitu rerata 0% dan jumlah tertinggi pada dosis kontrol yaitu 12,6%.

Hasil uji lanjut untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok:

Tabel 7. Hasil Uji Lanjut Post hoc-test (Games-Howell)

	Kontrol	125mg	200mg	275mg	350mg
Kontrol		0,031	0,000	0,000	0,000
125 mg	0,031		0,021	0,002	0,002
200 mg	0,000	0,021		0,005	0,005
275 mg	0,000	0,002	0,005		0
350 mg	0,000	0,002	0,005	0	

Hasil Post hoc-test diperoleh pada dosis 125 mg, 200 mg, 275 mg dan 350 mg memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan jumlah fetus hidup dan berbeda dengan kontrol.

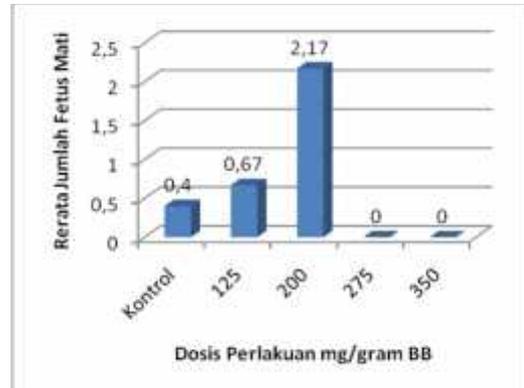
6. Perbedaan Jumlah Fetus Mati antar Kelompok Perlakuan

Rata-rata jumlah fetus mati tikus pada hari ke-16 kebuntingan yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel di bawah ini:

Tabel 8. Perbedaan Jumlah Fetus Mati antar Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	n	$\bar{x} \pm SD$	p value
Kontrol	6	0,40 ± 0,89	0,005
125 mg/gram BB	6	0,67 ± 1,21	
200 mg/gram BB	6	2,17 ± 1,60	
275 mg/gram BB	6	0,00 ± 0,00	
350 mg/gram BB	6	0,00 ± 0,00	

Dari tabel 8 dapat dilihat pemberian ekstrak daun pegagan dapat mempengaruhi jumlah rata-rata fetus mati antar kelompok perlakuan. Hasil uji One Way Anova di dapatkan nilai p value=0,005 dengan nilai $\alpha=0,05$ ($p < \alpha$) hal ini menunjukkan, ada perbedaan jumlah implantasi antar kelompok perlakuan.



Gambar 5. Histogram pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata jumlah fetus mati

Gambar histogram 5 memperlihatkan mengenai hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata fetus mati. Terjadi penurunan jumlah fetus mati pada dosis perlakuan, jumlah terendah dosis 275 mg dan 350 mg yaitu rerata 0% dan tertinggi pada dosis 200 mg yaitu 2,17%.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok dilakukan uji lanjut:

Tabel 9. Hasil Uji Lanjut Post hoc-test (Games-Howell)

	Kontrol	125mg	200mg	275mg	350mg
Kontrol		0,992	0,236	0,844	0,844
125 mg	0,992		0,413	0,679	0,679
200 mg	0,236	0,413		0,099	0,099
275 mg	0,844	0,679	0,099		0
350 mg	0,844	0,679	0,099	0	

Hasil Post hoc-test diperoleh pada dosis 125 mg, 200 mg, 275 mg dan 350 mg tidak memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan jumlah fetus mati dan sama dengan kontrol.

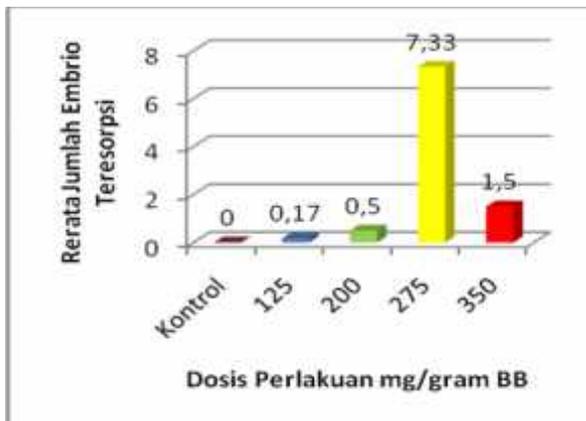
7. Perbedaan Jumlah Embrio Teresorpsi antar Kelompok Perlakuan

Rata-rata jumlah embrio teresorpsi pada hari ke-16 kebuntingan yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel di bawah ini:

Tabel 10. Perbedaan Teresorpsi Perlakuan Jumlah antar Embrio Kelompok

Kelompok Perlakuan	n	$\bar{x} \pm SD$	p value
Kontrol	6	0,00 ± 0,00	0,000
125 mg/gram BB	6	0,17 ± 0,40	
200 mg/gram BB	6	0,50 ± 0,83	
275 mg/gram BB	6	7,33 ± 1,86	
350 mg/gram BB	6	1,50 ± 2,34	

Tabel 10 menunjukkan rata-rata jumlah embrio teresorpsi antar kelompok perlakuan didapatkan kelompok ekstrak daun pegagan dosis 275mg mempunyai jumlah embrio teresorpsi tinggi (7,33%) di banding kelompok lain dan kontrol. Hasil uji *One Way Anova* nilai *p value* = 0,000 nilai $\alpha = 0,05$ ($p < \alpha$) hal ini menunjukkan ada perbedaan persentase kehilangan gestasi antar kelompok perlakuan.



Gambar 6. Histogram pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata jumlah embrio teresorpsi

Gambar 6 memperlihatkan hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata embrio teresorpsi. Terjadi peningkatan embrio teresorpsi pada dosis perlakuan, jumlah tertinggi dosis 275 mg yaitu 7,33% dan pada dosis 350 mg lebih sedikit yaitu rerata 1,50% sedangkan jumlah terendah terdapat pada kontrol yaitu 0%.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok dilakukan uji lanjut dan didapatkan hasil sebagai berikut:

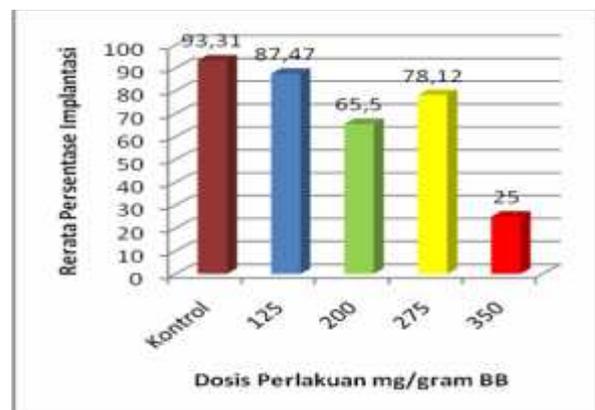
Tabel 11. Hasil Uji Lanjut Post hoc-test (Games-Howell)

	Kontrol	125mg	200mg	275mg	350mg
Kontrol		0,846	0,621	0,001	0,570
125 mg	0,846		0,897	0,001	0,666
200 mg	0,621	0,897		0,001	0,854
275 mg	0,001	0,001	0,001		0,006
350 mg	0,570	0,666	0,854	0,006	

Dari hasil *Post hoc-test* diperoleh pada dosis 125 mg, 200 mg dan 350 mg tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan jumlah embrio teresorpsi dan sama dengan kontrol sedang dosis 275 mg memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan jumlah embrio teresorpsi dan berbeda dengan kontrol.

8. Perbedaan Rata-rata Persentase Implantasi antar Kelompok Perlakuan

Rata-rata persentase implantasi setelah pemberian ekstrak daun pegagan dengan berbagai dosis selama 7 hari, didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak daun pegagan dapat mempengaruhi jumlah rata-rata persentase implantasi. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai *p value* = 0,000 dengan nilai $\alpha = 0,05$ ($p < \alpha$) hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan persentase implantasi antar kelompok perlakuan.



Gambar 7. Histogram pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata persentase implantasi.

Gambar 7 memperlihatkan mengenai hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata persentase implantasi. Terjadi penurunan persentase implantasi pada dosis perlakuan, jumlah terendah dosis 350 mg, rerata 25% dan tertinggi pada dosis kontrol yaitu 93,310%.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok dilakukan uji lanjut dan didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 12. Hasil Uji Lanjut Post hoc-test (Games-Howell)

	Kontrol	125mg	200mg	275mg	350mg
Kontrol		0,327	0,021	0,008	0,038
125 mg	0,327		0,063	0,051	0,054
200 mg	0,021	0,063		0,362	0,234
275 mg	0,008	0,051	0,362		0,096
350 mg	0,038	0,054	0,234	0,096	

9. Perbedaan Rata-rata Persentase Kehilangan Gestasi (KGE) antar Kelompok Perlakuan

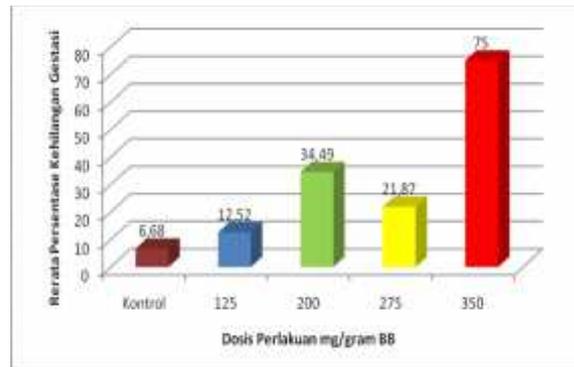
Rata-rata persentase kehilangan gestasi setelah pemberian ekstrak daun pegagan dengan berbagai dosis selama 7 hari, didapatkan hasil:

Tabel 13. Perbedaan Rata-rata Persentase Kehilangan Gestasi (KGE) antar Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	n	$\bar{x} \pm SD$	<i>p value</i>
Kontrol	6	6,68 ± 6,01	0,000
125mg/gram BB	6	12,52 ± 3,59	
200mg/gram BB	6	34,49 ± 14,41	
275mg/gram BB	6	21,87 ± 5,69	
350mg/gram BB	6	75,00 ± 39,08	

Tabel 13 menunjukkan rata-rata persentase kehilangan gestasi antar kelompok perlakuan didapatkan pada kelompok ekstrak daun pegagan dosis 350 mg mempunyai persentase kehilangan gestasi tinggi yaitu 75,00% di bandingkan kelompok lain dan kontrol. Hasil uji *One Way Anova* nilai *p value* = 0,000, nilai $\alpha = 0,05$ ($p < \alpha$) hal ini menunjukkan ada perbedaan persentase kehilangan gestasi antar kelompok perlakuan.

Kelompok Perlakuan	n	$\bar{x} \pm SD$	<i>p value</i>
Kontrol	6	2,38 ± 5,83	0,000
125mg/gram BB	6	10,66 ± 16,60	
200mg/gram BB	6	41,05 ± 18,20	
275mg/gram BB	6	100,00 ± 0,00	
350mg/gram BB	6	33,33 ± 51,63	
BB			



Gambar 8. Histogram Pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata persentase kehilangan gestasi

Gambar histogram 8 memperlihatkan mengenai hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata persentase kehilangan gestasi. Terjadi peningkatan persentase kehilangan gestasi pada dosis perlakuan, jumlah tertinggi yaitu dosis 350 mg yaitu rerata 75% dan jumlah terendah pada dosis kontrol yaitu 6,68%.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok dilakukan uji lanjut dan didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 14. Hasil Uji Lanjut Post hoc-test (Games-Howell)

	Kontrol	125mg	200mg	275mg	350mg
Kontrol		0,327	0,021	0,008	0,038
125 mg	0,327		0,063	0,051	0,054
200 mg	0,021	0,063		0,362	0,234
275 mg	0,008	0,051	0,362		0,096
350 mg	0,038	0,054	0,234	0,096	

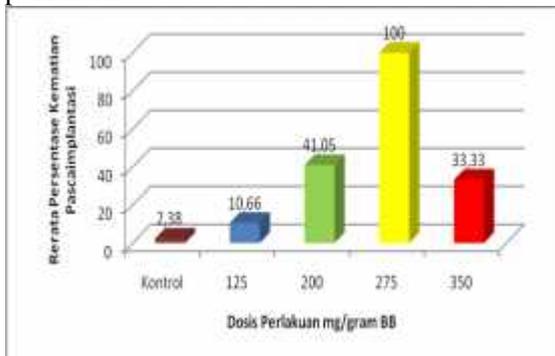
Dari hasil *Post hoc-test* diperoleh dosis ekstrak 125 mg memberi efek yang tidak berbeda dengan kontrol. Pada dosis 200 mg, dosis 275 mg dan dosis 350 mg memberikan pengaruh yang nyata terhadap persentase kehilangan gestasi dan berbeda dengan kontrol.

Persentase kehilangan gestasi adalah jumlah korpus luteum dikurangi jumlah implantasi di bagi dengan jumlah korpus luteum dikali 100 %. Hasil dari penelitian ini semakin tinggi dosis yang diberikan jumlah korpus luteum dan jumlah implantasi sedikit, sehingga meningkatkan persentase kehilangan gestasi jika di banding dengan kontrol.

Dari hasil penelitian ini terjadi gangguan pada ovulasi. Sehingga dapat menyebabkan sel telur yang di fertilisasi juga menurun dan selanjutnya menurunkan implantasi hal ini berarti meningkatkan kehilangan gestasi.

10. Perbedaan Rata-rata Persentase Kematian Pascaimplantasi (KPI) antar Kelompok Perlakuan

Rata-rata persentase kematian pascaimplantasi setelah pemberian ekstrak daun pegagan dengan berbagai dosis selama 7 hari, didapatkan hasil bahwa rata-rata persentase kematian pascaimplantasi antar kelompok perlakuan didapatkan pada kelompok ekstrak daun pegagan dosis 275 mg mempunyai persentase kematian pascaimplantasi yang tinggi yaitu 100% sedangkan pada kelompok ekstrak pegagan dosis 350 mg ditemukan persentase kematian pascaimplantasi yaitu 33,33%. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai *p value* = 0,000 dengan nilai $\alpha = 0,05$ ($p < \alpha$) hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan persentase kematian pascaimplantasi antar kelompok perlakuan.



Gambar 9. Histogram pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak daun pegagan terhadap rerata persentase kematian pascaimplantasi

Gambar histogram 9 memperlihatkan mengenai hubungan penambahan dosis perlakuan dengan rerata persentase kematian pascaimplantasi. Terjadi peningkatan persentase kematian pascaimplantasi pada dosis perlakuan, jumlah tertinggi yaitu dosis 275 mg yaitu rerata 100% dan jumlah terendah pada dosis kontrol yaitu 2,38%.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada masing-masing kelompok dilakukan uji lanjut dan didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 15. Hasil Uji Lanjut Post hoc-test (Games-Howell)

	Kontrol	125mg	200mg	275mg	350mg
Kontrol		0,776	0,014	0,000	0,622
125 mg	0,776		0,076	0,000	0,837
200 mg	0,014	0,076		0,003	0,996
275 mg	0,000	0,000	0,003		0,115
350 mg	0,622	0,837	0,996	0,115	

Dari hasil *Post hoc-test* terlihat bahwa pada ekstrak pegagan dosis 200 mg, dosis 275 mg baru terlihat persentase kematian pascaimplantasi dibandingkan dengan kontrol sedangkan pada dosis 125 mg dan dosis 350 mg belum terlihat penurunan persentase kematian pascaimplantasi.

PEMBAHASAN

1. Perbedaan Jumlah Korpus Luteum antar Kelompok Perlakuan

Hasil penelitian ini terjadi penurunan jumlah korpus luteum. Korpus luteum terbentuk dari sisa folikel *de graaf* yang mengovulasikan oositnya. Perkembangan folikel dan ovulasi di pengaruhi hormon FSH dan LH. Selama perkembangan folikel berlangsung akan mensekresikan estrogen dan progesteron. Penambahan ekstrak daun pegagan yang mengandung triterpenoid saponin akan mempengaruhi kadar estrogen dan progesteron, selanjutnya kedua hormon ini akan memberikan umpan balik negatif ke hipotalamus dan hipofisis. Akibatnya kadar FSH dan LH turun sehingga perkembangan folikel terganggu dan jumlah korpus luteum yang dihasilkan menjadi sedikit.

Ekstrak daun pegagan dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium. Pada hewan betina, *gonadotrophin releasing hormone* (GnRH) disekresikan dari hipotalamus merangsang pelepasan *lutensizing hormone* (LH) and *follicle stimulating hormone* (FSH) dari pituitari anterior. FSH and LH disekresikan dengan taraf yang berbeda pada periode siklus estrus. Pada awal siklus (*fase follicular*), FSH merangsang perkembangan folikel-folikel, salah satu diantaranya berkembang cepat menjadi folikel *de Graaf* (GF). Folikel *de Graaf* mensekresikan hormon estradiol (Hernawati, 2011). Pada pertengahan siklus estrus LH menyebabkan folikel *de Graaf* pecah pada proses ovulasi dan akan menjadi korpus luteum.

Korpus luteum mensekresikan progesteron dan hormon progesteron yang dihasilkan sangat tergantung pada perkembangan korpus luteum, jika perkembangan korpus luteum berlangsung normal, akan dihasilkan kadar hormon yang normal. Sebaliknya jika selama proses perkembangan, jumlah korpus luteum menurun mengakibatkan produksi progesteron terganggu. Hal ini sangat tergantung pada besarnya gangguan yang terjadi selama proses perkembangan korpus luteum (Hernawati, 2011).

Hal ini sesuai penelitian Fitriyah (2009), yang memperlihatkan bahwa ekstrak daun pegagan terhadap perkembangan folikel ovarium mencit didapatkan hasil: pada dosis 100 mg/KgBB, dan 125 mg/KgBB, tidak ditemu-kannya folikel yang mencapai folikel *de Graaf* besar kemungkinan tidak terjadi ovulasi. Hal tersebut dikarenakan jumlah zat aktif yang terkandung dalam dosis memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan dan perkembangan folikel.

2. Perbedaan Jumlah Implantasi antar Kelompok Perlakuan

Dari asil *Post hoc-test* diperoleh dosis ekstrak 125 mg, 200 mg, 275 mg dan dosis 350 mg memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan jumlah implantasi dan berbeda dengan kontrol.

Jumlah implantasi yaitu, total dari jumlah fetus hidup, fetus mati dan embrio teresorpsi. Dari hasil penelitian rata-rata jumlah implantasi antar kelompok perlakuan menurun sampai dosis 350 mg mencapai 1,50%. Pada dosis 275 mg jumlah implantasi mencapai 7,33% tetapi pada dosis 200 mg jumlah implantasi lebih sedikit 6,50%. Pada dosis 275 jumlah implantasi lebih tinggi dibanding dosis 200 mg hal ini disebabkan semua jumlah implantasi teresorpsi pada dosis 275 mg. Kegagalan implantasi dapat dikarenakan uterus tidak siap menerima embrio pada saat seharusnya implantasi terjadi, sehingga embrio tidak mampu lagi melakukan implantasi.

Kandungan dari triterpenoid saponin selain asiaticosida terdapat juga madecosida dan asam asiatic. Asam asiatic diduga bersifat sitotoksik bila kadarnya dalam darah berlebihan akan menyebabkan apoptosis sel pada folikel ovarium. Apoptosis sel pada folikel yang terjadi akibat asam asiatic dimulai dengan rusaknya mitokondria sehingga sitokrom C akan terdisosiasi dari membran mitokondria. Akibatnya permukaan sel akan menggelembung seperti balon dan kromatin (DNA bersama proteinnya) mengalami degradasi.

3. Perbedaan Jumlah Fetus Hidup Antar Kelompok Perlakuan

Pada Tabel 6 di atas menunjukkan bahwa rata-rata jumlah fetus hidup antar kelompok perlakuan didapatkan semakin tinggi dosis maka

jumlah fetus hidup semakin sedikit. Pada dosis 275 mg dan 350 mg tidak ditemukan fetus yang hidup (0%).

Fetus hidup adalah fetus yang berimplantasi pada uterus dan dibungkus oleh lapisan amnion dan berwarna merah muda (Gardenia, 1997). Penurunan rata-rata jumlah fetus hidup pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak pegagan dikarenakan fetus yang akan terbentuk mengalami kematian intrauterin (fetus mati dan embrio teresorpsi).

Fetus dalam kandungan dilindungi oleh plasenta dan selaput ketuban, namun tidak terlepas dari pengaruh buruk zat yang dikonsumsi induk. Kecepatan zat menembus barier plasenta tergantung besarnya molekul, kelarutan dalam lemak, dan derajat ionisasinya. Jumlah fetus menurun dengan meningkatnya dosis ekstrak daun pegagan yang diberikan. Hal ini dikarenakan semakin tinggi dosis akan mempengaruhi pembelahan sel fetus sehingga frekuensi pembelahan sel menurun. Jumlah penurunan fetus yang terjadi tidak sama pada setiap induk karena respon yang berbeda antara tiap induk terhadap ekstrak (Yulianty & Nawir, 2008). Fetus dalam kandungan dilindungi oleh plasenta dan selaput ketuban, namun tidak terlepas dari pengaruh buruk zat yang dikonsumsi induk. Kecepatan zat menembus barier plasenta tergantung besarnya molekul, kelarutan dalam lemak, dan derajat ionisasinya.

Hal ini sesuai dengan penelitian Ong (2013) mengenai Ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill) memiliki efek pengurangan jumlah fetus pada dosis 2527mg/kgBB dan 3249mg/kgBB mencit, dikarenakan pemberian dosis teratogen yang terlalu tinggi sehingga terjadi pengurangan atau bahkan peniadaan jumlah fetus yang dihasilkan pada awal proses pembentukan embrio.

4. Perbedaan Jumlah Fetus Mati antar Kelompok Perlakuan

Pada Tabel 8 di atas telah ditunjukkan bahwa rata-rata jumlah fetus mati antar kelompok perlakuan didapatkan pada dosis 275 mg dan 350 mg tidak ditemukan fetus yang mati (0%) karena semua implantasi teresorpsi, sedangkan pada dosis 200 mg fetus mati meningkat sebanyak 2,17%.



Gambar 10. Fetus Mati

Fetus mati adalah fetus yang berimplantasi pada uterus dan dibungkus oleh lapisan amnion dan berwarna putih pucat (Gardenia, 1997).

Kematian fetus tidak terjadi pada setiap induk karena kemampuan yang berbeda dari masing-masing induk dalam memetabolisir ekstrak daun pegagan. Diduga fetus yang mati sejak dalam kandungan belum selesai mengalami perkembangan dibanding fetus yang lahir dalam keadaan hidup (Santoso, 2006).

Hasil penelitian Siburian dan Marlinza (2009), pemberian ekstrak akar pasak bumi pada tahap prakopulasi dosis 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah implantasi dan berat fetus, tetapi berpengaruh nyata terhadap penurunan persentase fetus hidup dan berat ovarium.

5. Perbedaan Jumlah Embrio Teresorpsi Antar Kelompok Perlakuan

Pada Tabel 10 jumlah embrio teresorpsi meningkat sampai dosis 275 tetapi pada dosis 350 menurun. Hal ini disebabkan pada dosis 275 jumlah implantasi lebih tinggi dibanding dosis 350. Embrio teresorpsi biasanya terjadi pada periode pascaimplantasi awal.



Gambar 11. Embrio Teresorpsi pada dosis 275 mg

Embrio teresorpsi merupakan gumpalan darah berwarna hitam dengan sisa jaringan embrio yang termaserasi atau tanpa jaringan embrio (Adnan, 1992). Embrio resorpsi disebabkan oleh senyawa aktif ekstrak daun pegagan pada dosis 275 mg dan 350 mg yang dapat mempengaruhi lingkungan uterus. Menurut Tomaszewska (1991) lingkungan uterus selama fase embrio peka terhadap hormon ovari terutama progesteron, dan waktu masuknya embrio kedalam uterus karena sangat berpengaruh terhadap daya hidup embrio.

6. Perbedaan Rata-rata Persentase Implantasi antar Kelompok Perlakuan

Dari hasil *Post hoc-test* diperoleh dosis ekstrak 125 mg memberi efek yang tidak berbeda dengan kontrol. Pada dosis 200 mg, dosis 275 mg dan dosis 350 mg memberikan pengaruh yang nyata terhadap persentase implantasi dan berbeda dengan kontrol.

Persentase implantasi adalah jumlah implantasi dibagi jumlah korpus luteum dikali seratus persen. Hasil dari penelitian ini semakin tinggi dosis yang diberikan jumlah korpus luteum dan jumlah implantasi semakin sedikit, sehingga menurunkan persentase implantasi jika di banding dengan kontrol.

Pemberian ekstrak daun pegagan selama tahap praovulasi ternyata mampu menurunkan fertilitas tikus betina. Persentase implantasi rata rata tikus yang diberi ekstrak daun pegagan dosis 350 mg/gram b.b. lebih rendah dari tikus yang diberi ekstrak daun pegagan dosis 125mg/gram b.b. Namun persentase implantasi keempat kelompok perlakuan tersebut secara meyakinkan jauh lebih rendah dibanding kelompok kontrol, sehingga tampak bahwa penurunan persentase

implantasi tersebut seiring dengan meningkatnya dosis yang diberikan.

Astuti (2008) berhasil membuktikan bahwa pemberian ekstrak daun mangga dengan dosis 100 mg/kg b.b. pada frekuensi penyuntikan yang berbeda selama periode praimplantasi mampu menurunkan persentase implantasi. Hasil penelitian juga menunjukkan penurunan persentase implantasi terjadi seiring dengan peningkatan frekuensi penyuntikan ekstrak daun mangga.

7. Perbedaan Rata-rata Persentase Kehilangan Gestasi (KGE) antar Kelompok Perlakuan

Kandungan dari daun pegagan yaitu triterpenoid saponin, mengandung steroid yaitu diosgenin atau yang sering disebut dengan genin. Genin dapat diubah menjadi progesteron melalui proses kimia yang disebut penguraian maker yang menghasilkan testosteron dan estradiol. Progesteron dibentuk dari pregnenolon melalui penghilangan atom hydrogen dari C3 dan pergeseran ikatan ganda dari cincin B pada posisi 5-6 ke cincin A pada posisi 4-5, perubahan ini oleh adanya bantuan enzyme 3 hidroksi dehidrogenase dan 4-5 isomerase, selanjutnya dengan bantuan enzyme 17 hidroksilase, progesteron akan diubah menjadi 17 hidroksi progesteron yang kemudian mengalami demolase menjadi bentuk testosteron, yang selanjutnya testosteron mengalami aromatisasi (pembentukan gugus hidroksi fenolik pada atom C3) menjadi estradiol (E2). Kadar estradiol yang tinggi menghambat hipofisis ante-rior dengan umpan balik negatif, sehingga hor-mon FSH dan LH tidak dikeluarkan oleh hipo-fisis anterior, maka mengganggu proses perkembangan sel folikel ovarium, sehingga ovulasi tidak terjadi, maka tidak terbentuk korpus luteum yang berfungsi mensekresikan hormon progesteron

Hal ini sesuai dengan penelitian Fitriyah (2009), dengan memperlihatkan bahwa ekstrak daun pegagan terhadap perkembangan folikel ovarium pada mencit didapatkan hasil bahwa, pada dosis 100 mg/KgBB, dan 125 mg/KgBB, tidak ditemukannya folikel yang mencapai folikel *de Graaf* besar kemungkinan tidak terjadi ovulasi. Hal tersebut dikarenakan jumlah zat aktif yang terkandung dalam dosis memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium.

8. Perbedaan Rata-rata Persentase Kematian Pascaimplantasi (KPI) antar Kelompok Perlakuan

Dari hasil *Post hoc-test* terlihat bahwa pada ekstrak pegagan dosis 200 mg, dosis 275 mg baru terlihat persentase kematian pascaimplantasi dibandingkan dengan kontrol sedangkan pada dosis 125 mg dan dosis 350 mg belum terlihat penurunan persentase kematian pascaimplantasi.

Persentase kematian pascaimplantasi adalah jumlah implantasi di kurang jumlah fetus hidup dibagi jumlah implantasi dikali seratus persen. Dari hasil penelitian persentase kematian pascaimplantasi meningkat sampai dosis 275 tetapi pada dosis 350 menurun. Hal ini disebabkan pada dosis 275 jumlah implantasi lebih tinggi dibanding dosis 350. Jumlah fetus hidup pada dosis 350 nol karena sedikitnya sel telur yang di ovulasi terlihat dari jumlah korpus luteum yang sedikit dan sisanya teresorpsi. Pada dosis 350 mg ada yang memiliki implantasi tetapi teresorpsi sehingga jumlah fetus hidup nol dan ada juga yang implantasinya nol.

Dari hasil pengamatan tampak bahwa kematian pascaimplantasi lebih disebabkan oleh embrio teresorpsi dan bukan oleh fetus mati sedangkan embrio teresorpsi terjadi pada periode pascaimplantasi awal.

Penurunan persentase implantasi dan peningkatan kehilangan gestasi serta kematian pascaimplantasi yang terjadi pada eksperimen dapat diakibatkan daun pegagan yang mengandung triterpenoid (Sindarti, 2007). Kandungan triterpenoid saponin dalam daun pegagan mengakibatkan penurunan estrogen dan progesteron yang menyebabkan tidak terjadinya ovulasi.

Korpus luteum pada bekas folikel akan menghasilkan estrogen dan progesteron. Fungsinya sebagai umpan balik negatif dengan akibat menurunnya sekresi FSH berjumlah besar. Sehingga tidak ada folikel baru yang tumbuh dalam ovarium (Sindarti, 2007).

Hasil penelitian Ayunita (2008) juga menunjukkan pemberian ekstrak daun mangga dosis 100 mg/kg b.b. pada tikus bunting selama periode pascaimplantasi awal meningkatkan persentase kematian pascaimplantasi.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) terhadap fertilitas tikus putih betina (*Rattus*

norvegicus) galur *wistar* dapat di ambil kesimpulan:

1. Pemberian ekstrak daun pegagan dosis 125 mg berpengaruh terhadap penurunan fertilitas namun tidak berbeda nyata dengan kontrol sedangkan dosis 200 mg, 275 mg dan 350 mg berpengaruh terhadap penurunan fertilitas.
2. Pemberian ekstrak daun pegagan dosis 125 mg berpengaruh terhadap persentase implantasi namun tidak berbeda nyata dengan kontrol sedangkan dosis 200 mg, 275 mg dan 350 mg berpengaruh terhadap persentase implantasi.
3. Pemberian ekstrak daun pegagan dosis 125 mg berpengaruh terhadap persentase kehilangan gestasi namun tidak berbeda nyata dengan kontrol sedangkan dosis 200 mg, 275 mg dan 350 mg berpengaruh terhadap persentase kehilangan gestasi.
4. Pemberian ekstrak daun pegagan dosis 125 mg berpengaruh terhadap persentase kematian pascaimplantasi namun tidak berbeda nyata dengan kontrol sedangkan dosis 200 mg, 275 mg dan 350 mg berpengaruh terhadap persentase kematian pascaimplantasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan. 1992. *Pengaruh Mangostin Terhadap Fungsi Reproduksi Mencit (Mus musculus) Swiss Webster Betina*. Tesis. Pasca sarjana. Jurusan Biologi ITB. p. 5-13 & 54-62.
- Annisa, R.F. 2006. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Pegagan (Centella asiatica) Terhadap Kemampuan Kognitif Dan Kadar Neutransmitter Monoamine Pada Hipokampus Tikus (Rattus norvegicus L)*. Skripsi. Bandung: ITB
- Astuti., Y.S. 2008. *Pengaruh frekuensi pencekokan ekstrak daun mangga (Mangifera indica L.) pada tahap praimplantasi terhadap fertilitas tikus putih betina (Rattus norvegicus) galur Sprague Dawley*. Skripsi. Sarjana Pendidikan Biologi UHAMKA.
- Ayunita., E. 2008. *Pengaruh ekstrak daun mangga (Mangifera indica L.) pada tahap pascaimplantasi awal terhadap fertilitas tikus putih (Rattus norvegicus) galur Sprague Dawley*. Skripsi. Sarjana Pendidikan Biologi UHAMKA
- Besung, K.N. 2009. *Pegagan (Centella asiatica) Sebagai Alternative Pencegahan Infeksi Pada Ternak*. *Jurnal Penelitian vol.2.no 1 26 agustus 2009*. Bali: Universitas Udayana
- Fitriyah. 2009. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan Terhadap Folikel Ovarium*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gardenia, L. 1997. *Pengaruh xamton terhadap kehamilan awal tikus (Rattus norvegicus) galur wistar*. Skripsi. Jurusan Biologi ITB. P. 10-11 & 27.
- Hasanah, U. 2006. *Kemampuan Anti MPS (Mayor Physiological Protein Substrat) Dalam Menghambat Proses Kapasilasi Dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing, Domba, Dan Sapi*. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hernawati. 2011. *Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon Dari Tanaman Kedelai*. Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.
- Siburian, J. dan Marlinza. 2009. *Efek Pemberian Ekstrak Akar Pasak Bumi (Eurycoma Longifolia Jack) Pada Tahap Prakopulasi Terhadap Fertilitas Mencit (Mus Musculus L) Betina*. *Jurnal*. Jambi: Universitas Jambi.
- Walpole, Ronald. 1995. *Ilmu Peluang dan Statistika untuk Insinyur dan Ilmuwan*. Bandung: ITB.