

AKTIVITAS TANIN DAUN BELUNTAS TERHADAP KONSENTRASI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN

Beluntas leaf tannin activity against spermatozoa concentration white male rats

Rr. Eko Susetyarini

Jurusan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Muhammadiyah Malang
Jl. Raya Tlogomas 246, Malang 65144
Email: niniek08@gmail.com

ABSTRACT

*Antifertility of traditional medicine has not been revealed. Antifertility men who have used the form of injections, namely testosterone, it is necessary antifertility of medicinal plants revealed that beluntas (*Pluchea indica*). Beluntas antifertility can be used as a drug in mice (stage pre-clinical trials) (Susetyarini, 2011). This study is a continuation of the tannins that can lower sperm fertilization potential of rat (Susetyarini, 2010). Assessment of leaf tannin in influencing concentration of beluntas spermatozoa has not been done, it is necessary to study leaf tannins beluntas against concentration of spermatozoa. Concentration of spermatozoa role in the fertilization process. This study aims to prove the leaf tannin beluntas against spermatozoa concentration white male rats. The research used the experimental treatment control group (without giving tannin), giving tannin treatment groups with as many as 0.8 ml to a white male adult rats were repeated 3 times. Giving time for 60 days. Observations at the time treatment was stopped (0 days); discharged after treatment, rats were left for 7 days, 14 days, and 21 days. Each observation time and was taken off the white rat epididymis and giving spermatozoa. Data were analyzed using ANOVA and Duncan's test further. Results of data analysis showed that $p < 0.05$ means giving tannin beluntas shown to decrease sperm concentration. Highest concentration of spermatozoa when white male rats were left for 14 days after treatment was stopped Concentration lows while white male rats were left for 7 days after treatment was stopped*

Key word: Tannis leaf belintas, concentration of spermatozoa, white rat

ABSTRAK

Antifertilitas dari obat tradisional belum terungkap. Antifertilitas pria yang telah menggunakan bentuk suntikan, yaitu testosteron, maka hal ini memerlukan antifertilitas tanaman obat yang terungkap dari beluntas (*Pluchea indica*). Beluntas antifertilitas dapat digunakan sebagai obat pada tikus (tahap uji coba pra-klinis) (Susetyarini, 2011). Penelitian ini merupakan kelanjutan dari tanin yang dapat menurunkan potensi pembuahan sperma tikus (Susetyarini, 2010). Penilaian tannin daun dalam mempengaruhi konsentrasi spermatozoa beluntas belum dilakukan, maka perlu untuk mempelajari tanin daun beluntas terhadap konsentrasi spermatozoa. Peran konsentrasi spermatozoa dalam proses pembuahan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan daun beluntas tannin terhadap spermatozoa konsentrasi tikus putih jantan. Penelitian ini menggunakan kelompok kontrol perlakuan eksperimental (tanpa memberikan tannin), memberikan kelompok perlakuan tannin dengan sebanyak 0,8 ml ke tikus jantan dewasa putih diulang 3 kali. Memberikan waktu selama 60 hari. Pengamatan pada waktu pengobatan dihentikan (0 hari); habis setelah pengobatan, tikus yang tersisa selama 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Setiap kali observasi dan diambil dari epididimis tikus putih dan memberikan spermatozoa. Data dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan tes ANOVA dan Duncan. Hasil analisis data menunjukkan bahwa $p < 0,05$ tannin pada beluntas terbukti menurunkan konsentrasi sperma. Konsentrasi tertinggi spermatozoa ketika tikus putih jantan yang tersisa selama 14 hari setelah pengobatan dihentikan Konsentrasi terendah ketika tikus putih jantan yang tersisa selama 7 hari setelah pengobatan dihentikan.

Kata kunci: daun beluntas Tanin, konsentrasi spermatozoa, tikus putih

PENDAHULUAN

Obat tradisional dari tanaman yang digunakan sebagai antifertilitas belum banyak diungkap, salah satu tanaman antifertilitas, yaitu beluntas (*Pluchea indica*) yang berpengaruh pada kualitas spermatozoa diberikan ke tikus putih dengan cara dibuat dekok (Susetyarini, 2005). Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya telah diperoleh bahwa senyawa aktif daun beluntas berupa tanin, alkaloid dan flavonoid berpengaruh pada proses spermatogenesis, kadar testosteron dan jumlah anakan tikus putih betina. Senyawa aktif flavonoid yang efektif dalam mempengaruhi jumlah sel spermatogonia, sel spermatosit, sel spermatid dan sel spermatozoa. Tanin dari daun beluntas segar dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa (motilitas (5%), mortalitas (71,5%), abnormalitas (24,25%) dan livibilitas (28,5%)) dengan volume pemberian 0,8 ml (Wahyuni dan Susetyarini, 2007). Kadar hormon tikus putih jantan yang diberi seanyawa aktif bubuk tanin dari daun beluntas dengan kadar testosteron sebesar 194,00 ng/dl dan terendah pada pemberian senyawa aktif bubuk alkaloid sebesar 158,50 ng/dl (Susetyarini dan Wahyuni, 2008). Tanin dapat menurunkan potensi fertilisasi spermatozoa tikus (Susetyarini, 2010). Kadar tanin dari daun beluntas segar 0,61% dan pada daun beluntas kering 1,885%. Penelitian ini menggunakan daun beluntas kering yang diisolasi fraksi taninnya. Tannin senyawa aktif yang terkandung pada tumbuhan yang bersifat fenol, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Tanin ternyata dapat menghambat sintesa protein (Robinson, 2003).

Tanin pada tanaman *Curcuma domestica* dapat menggumpalkan spermatozoa, alkaloid Cucurbitasin akan menekan sekresi hormon reproduksi, yaitu hormon testosteron sehingga proses spermatogenesis terganggu. Pengkajian

karateriktik tanin dalam mempengaruhi spermatogenesis tikus putih jantan yang akan berakibat pada proses fertilisasi belum pernah dilakukan (Susetyarini, 2011).

Menurut Soehadi dan Santa dalam (Susetyarini, 2011) alkaloid steroid menyebabkan pelepasan FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) yang disekresi dari hipofisa anterior akan terganggu. FSH berperan sebagai mediator untuk mengikat androgen dalam spermatogenesis, jika FSH terganggu maka spermatogenesis menjadi terhambat (Ghufron dan Herwiyanti, 1995) serta kualitas spermatozoa menurun sehingga fertilitas akan menurun. Proses spermatogenesis terdapat 2 tahapan, yaitu spermatositogenesis, proses pembentukan spermatogonia menjadi spermatid yang dipacu oleh hormon FSH. Spermiogenesis, adalah proses pembentukan spermatid menjadi spermatozoa yang dipacu oleh hormon LH (*Luteinizing hormone*). Proses spermatogenesis terjadi pada tubulus seminiferus testis. Proses spermatogenesis juga dikontrol oleh hormon testosteron yang berakibat negatif *feed back* pada poros hipotalalamus dan hipofisa.

Gangguan yang terjadi pada proses spermatogenesis akan berpengaruh pada kualitas spermatozoa yang disekresikan. Kualitas spermatozoa menurun berpengaruh pada potensi fertilisasi (Susetyarini, 2010) yang berakibat pada jumlah anakan dari tikus putih betina. Kualitas spermatozoa dapat dilihat dari parameter konsentrasi spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa yang baik bila didapatkan jumlah spermatozoa kira-kira 1,7 juta/ml pada tikus putih jantan (Susetyarini, 2010). Konsentrasi spermatozoa 1,7 juta/ml bila di fertilisasi secara *in vitro* dengan ovum tikus putih betina akan terjadi fertilisasi.

Harapan penggunaan tanaman obat berupa tannin daun beluntas relatif aman, efektif dan murah. Untuk itu peneliti berusaha mengembangkan tanaman obat daun beluntas dalam mempengaruhi konsentrasi

spermatozoa tikus putih jantan sebagai langkah awal uji pre-klinik. Belum dikaji karakteristik tanin dalam mempengaruhi konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan yang akan berakibat pada proses fertilisasi.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimen dengan rancangan percobaan RAK. Jenis senyawa aktif daun beluntas berupa fraksi tannin cair. Dosis yang digunakan 0,8 ml dan kontrol (pemberian aquades) selama 60 hari. Pengkoleksian spermatozoa dari epididimis dilakukan saat perlakuan diberhentikan (0 hari); dibiarkan selama 7 hari, 14 hari, 21 hari serta kelompok yang tanpa diberi tanin daun beluntas.

Populasi yang digunakan ialah tikus putih jantan (*Ratus norvegicus*) umur 2-3 bulan strain Wistar dengan bobot badan rata-rata 150-175 g. Sampel yang diperlukan sebanyak 15 ekor tikus putih jantan untuk melihat konsentrasi spermatozoa. Pengambilan sampel dilakukan secara random.

Tempat penelitian ialah di laboratorium Biomedik FK UMM. Kandang tikus berukuran panjang 45 cm, lebar 35 cm, dan tinggi 18 cm, yang berisi seperangkat tempat makan dan minum. Alat yang digunakan ialah spuit disposable, seperangkat alat bedah, tabung plastik, mikroskop cahaya binocular (Olympus CH21) Japan, kamera digital Olympus.

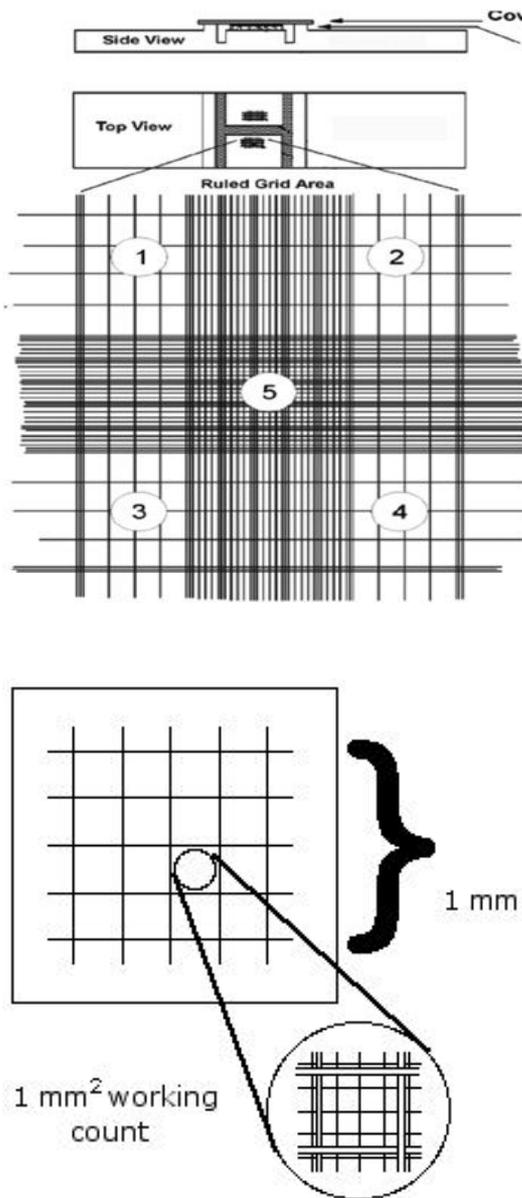
Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi tannin daun beluntas. Variabel terikat adalah konsentrasi spermatozoa. Variabel yang dikendalikan oleh peneliti adalah suhu, kandang, pakan, minum tikus putih, dan pencahayaan 12 jam pada waktu malam hari.

Sebelum diberi perlakuan, hewan coba diaklimatisasi selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium. Perlakuan yang diberikan berupa tanin daun beluntas 0,8 ml.pada tikus putih jantan sedangkan kelompok kontrol diberi aquades secara oral setiap sehari. Selama percobaan, pakan dan air minum PDAM diberikan secara *ad libitum*. Pakan

yang diberikan adalah berupa pelet pakan (Br2). Setiap tahapan waktu pengamatan tikus putih jantan dimatikan, dibedah dan organ epididimis diambil untuk dikoleksi spermatozoanya. Metode yang digunakan untuk pemeriksaan konsentrasi spermatozoa menggunakan alat hitung hemocytometer dan kamar hitung Neubauer. Spermatozoa yang telah diencerkan dengan TRIS 0,5 ml diambil 10-15 μ l dan diencerkan menggunakan NaCl 0,9% dengan pengenceran 200 kali (Susetyarini, 2011b). Kamar hitung Neubauer yang sudah diberi kaca penutup dan diletakkan di atas meja pada posisi mendatar, spermatozoa yang telah diencerkan dialirkan pada celah di pinggir kiri dan kanan kamar hitung. Pengamatan kamar Neubauer menggunakan mikroskop. Bidang hitung Neubauer dibatasi oleh garis-garis memiliki 25 kotak kecil yang masing-masing dibatasi oleh tiga buah garis di keempat sisinya (kiri, kanan, atas, dan bawah). Setiap kotak dibatasi tiga garis dan ada 16 kotak yang lebih kecil. Bidang hitung yang sudah nampak jelas, pembesaran mikroskop diubah menjadi 450 kali. Pilih lima kotak, yaitu kotak yang berada di setiap sudut (kiri atas, kanan atas, kiri bawah, kanan bawah, dan tengah) dapat dilihat pada gambar 1 (Susetyarini, 2011a)..

Spermatozoa di dalam kamar dihitung menurut arah diagonal, karena setiap kamar mempunyai 16 ruangan kecil maka di dalam 5 kamar terdapat 80 ruangan kecil. Seluruh gelas haemocytometer memiliki 400 ruangan kecil dan volume setiap ruangan kecil 0,1 mm³. Spermatozoa yang tersebar dalam setiap kotak dihitung sesuai dengan kotak yang dipilih dan dijumlahkan.

Apabila di dalam 5 kamar atau 80 ruangan kecil terdapat X spermatozoa X x 0,01 juta spermatozoa per mm³ atau X x 10 juta spermatozoa per ml (Toelihere dalam Susetyarini, 2011a).



Gambar 1. Kamar Hitung Neubaur (Susetyarini, dkk, 2010b)

Data konsentrasi spermatozoa dianalisis dengan menggunakan anava dan uji lanjut Duncan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pemberian tannin daun beluntas terhadap konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan, disajikan dalam bahasan, data tentang konsentrasi spermatozoa setelah diberi tanin daun beluntas dengan pengamatan (0 hr, 7 hr, 14 hr, dan 21 hari). Hasil data

pengamatan disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Rerata dan Standar deviasi (Sd) dan Notasi dari Konsentrasi Spermatozoa ($\times 10^6/ml$) Tikus Putih Jantan Setelah Diberi Tanin Daun Beluntas

| Perlakuan | Rata-rata dan Sd dari Konsentrasi Spermatozoa |
|------------------------------------|---|
| H+7 | $1,05 \pm 0,01^a$ |
| H0 | $1,14 \pm 0,00^b$ |
| H+21 | $1,34 \pm 0,01^c$ |
| H+14 | $1,54 \pm 0,01^d$ |
| Tanpa perlakuan (kontrol) | $1,63 \pm 0,01^e$ |

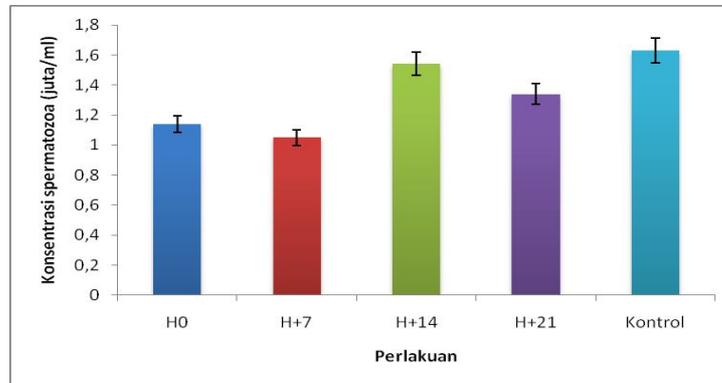
Keterangan:

- H0 = perlakuan pemberian tanin daun beluntas selama 60 hari dan pengamatan saat perlakuan diberhentikan
- H+7 = perlakuan pemberian tanin daun beluntas selama 60 hari dan pengamatan setelah 7 perlakuan diberhentikan
- H+14 = perlakuan pemberian tanin daun beluntas selama 60 hari dan pengamatan setelah 14 perlakuan diberhentikan
- H+21 = perlakuan pemberian tanin daun beluntas selama 60 hari dan pengamatan setelah 21 perlakuan diberhentikan

Pada tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa pemberian perlakuan tanin daun beluntas selama 60 hari dan pengamatan konsentrasi spermatozoa setelah dibiarkan selama 7 (H+7) $1,05 \times 10^6/ml$ didapatkan konsentrasi yang terendah dibanding saat perlakuan diberhentikan (H0), yaitu $1,14 \times 10^6/ml$. Perlakuan dengan pemberian tanin daun beluntas selama 60 hari, dibiarkan tanpa perlakuan dan pengamatannya 14 hari (H+14) setelah perlakuan menunjukkan konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan ($1,54 \times 10^6/ml$) hampir mendekati konsentrasi spermatozoa pada tikus putih yang tidak diberi

tanin daun beluntas ($1,63 \times 10^6/\text{ml}$). Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan yang diberi

tanin daun beluntas setelah perlakuan dihentikan serta dibiarkan selama 2 minggu konsentrasi spermatozoa akan kembali ke arah normal.



Gambar 1. Diagram Batang dari Konsentrasi Spermatozoa Tikus Putih Jantan Setelah Pemberian Tanin Daun Beluntas

Hasil analisis anava menunjukkan bahwa F hitung (2326,87), $p < 0,05$. Hasil analisis tersebut menyatakan bahwa hipotesis nol: “Tidak ada pengaruh tanin daun beluntas terhadap konsentrasi spermatozoa tikus putih dengan berbagai pengamatan”. Hipotesis penelitian menyatakan bahwa: “Ada pengaruh tanin daun beluntas terhadap konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan dengan berbagai pengamatan. Kesimpulan dari analisis anava menunjukkan bahwa tanin daun beluntas terbukti menurunkan konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan.

Pada pembahasan ini akan dikemukakan mengenai mekanisme tanin daun beluntas terhadap konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan. Hasil analisis ragam tanin daun beluntas berpengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan, Rekapitulasi hasil uji lanjut, sebagai berikut: 1) pemberian perlakuan tanin daun beluntas dan dihentikan selama 14 dapat mengembalikan konsentrasi spermatozoa mendekati konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan yang tidak diberi perlakuan tanin daun beluntas, 2). Konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan yang diberi tanin daun beluntas selama perlakuan dan dihentikan serta dibiarkan 7 hari menurunkan konsentrasi spermatozoa dibanding dengan konsentrasi

tikus putih jantan yang diamati pada saat perlakuan dihentikan, 3) konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan yang diberi tanin daun beluntas rata-rata masih di atas 1 juta/ml.

Temuan ini dapat dijelaskan sebagai berikut, tannin dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa yang menurun akibat perlakuan jenis senyawa aktif (tanin) terjadi pada saat spermatogenesis (Kapsul, 2000), karena terjadi penghambatan pembelahan sel (amitosis) saat spermatogenesis sehingga spermatozoa yang dihasilkan berkurang. Hal ini seiring dengan jumlah sel spermatogenik yang dihasilkan karena pemberian jenis senyawa aktif daun beluntas (Susetyarini, 2011b). Diduga senyawa aktif daun beluntas berupa tannin menyebabkan terganggunya sistem kontrol hormonal. Penyebab yang lain adalah kekurangan energi pada saat pemeliharaan di epididimis, banyak spermatozoa yang mengalami degenerasi dan reabsorpsi, sehingga konsentrasi spermatozoa menurun (Kapsul, 2004).

Diduga senyawa tannin pada daun beluntas termasuk fitosteroid yang bersifat sebagai estrogen agonis dengan menstimulasi respons estrogen sehingga berpotensi menimbulkan gangguan, mengakibatkan

rusaknya struktur membran plasma mitokondria spermatozoa akibat proses oksidasi radikal bebas dan menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid. Struktur internal mitokondria yang tidak sempurna sehingga mengakibatkan proses metabolisme spermatozoa terganggu (Astuti, 2009). Pembentukan peroksidasi lipid berhubungan dengan peningkatan pembentukan radikal bebas dan berkorelasi dengan penurunan motilitas spermatozoa, penurunan fosforilasi protein pada aksonem dan berkurangnya ATP intrasel (Iwaki, *et al.*, 1992; Asmarinah, 2005), serta mengganggu dan menghambat proses spermatogenesis akibat proses oksidasi pada membran sel testis maka konsentrasi spermatozoa berkurang.

Tannin dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa dibanding dengan pemberian senyawa aktif gabungan (alkaloid+flavonoid+tannin). Hal ini seiring dengan pemberian senyawa aktif tannin dalam menurunkan persentase motilitas spermatozoa, daya hidup spermatozoa serta menaikkan presentase abnormalitas spermatozoa. Senyawa aktif yang diberikan secara tunggal dengan senyawa aktif yang diberikan secara gabungan memberikan efek yang berbeda pada konsentrasi spermatozoa (Susetyarini, 2011b)

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian mengenai “Aktivitas tanin daun beluntas terhadap konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan” dapat disimpulkan sebagai berikut: 1).Tanin daun beluntas terbukti dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan dengan waktu pemberian selama 60 hari dan dibiarkan selama 7 hari. 2).Pemberian tanin daun beluntas selama 60 hari dan dibiarkan selama 7 hari merupakan pemberian yang efektif. Konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan dibiarkan selama 14 dan 21 hari akan kembali kearah normal karena konsentrasi spermatozoa yang dihasilkan mendekati rata-

rata konsentrasi tikus putih jantan yang tidak diberi perlakuan

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulazeez, Jubril. 2007. The Antispermatic and Antifertility Effects of Artemether on The Testes of Adult Wistar Rats. *Pak J Pathol.* 18(2): 64-67.
- Departemen Kesehatan RI, 2000. *Penelitian tanaman Obat di Beberapa Perguruan Tinggi di Indonesia*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta.
- Edeoga, 2005. Phytochemical Constituents Of Some Nigerian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(7).
- Gupta, Kachhawa and Rakhi Sharma. 2006. Antispermatic Effect of *Nyctanthes arbortristis* in Male Albino Rats. *Pharmacologyonline* 2: 261-273.
- Kapsul, 2007. Kadar Testosteron Tikus Putih Jantan Setelah Mengonsumsi Buah Terong Tukak (*Solanum* sp). *Bioscientiae*. Vol 4. No.1 hal 1-8.
- Pramono, H; Winarto, A; Rusdiyanto, E, 2010. Kerja Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) Terhadap Tingkah laku/Libido Tikus Putih Jantan. *Jurnal Matematika, Sains dan Teknologi*. 10 (1): 30-41.
- Robaire, B. 2008. The Challenges of Assessing The Quality of Spermatozoa. *Fertility and Sterility* Vol. 89. Supplement 1, February.
- Robinson, 2003. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB. Bandung
- Sadik, G. 2001. Antifertility Activity of *Pergularia daemia*. *Science* 1(1):22-24
- Shi YuLiang, et. Al. 2003. Ion-channels in Human Sperm Membrane and Contraceptive Mechanisms of Male Antifertility Coumpounnds Derived from Chinese Traditional Medicine. *Acta pharmacol Sin.* Jan:24(1):22-30

- Susetyarini, E, 2003. Kadar Testosteron Pada Tikus Putih Jantan (*Ratus norwegicus*) Yang Diberi Dekok Daun Beluntas. *Laporan Penelitian*. Lemlit UMM.
- Susetyarini, E, 2004. Jumlah Anakan Tikus Putih Betina (*Ratus norwegicus*) Yang Dikawinkan Dengan Tikus Putih Jantan (*Ratus norwegicus*) Yang Diberi Dekok Daun Beluntas. *Laporan Penelitian*. Lemlit UMM.
- Susetyarini, E, 2005. Antispermatojenik Dekok Daun Beluntas Pada Tikus Putih jantan (*Ratus norwegicus*). *Laporan Penelitian*. Lemlit UMM.
- Susetyarini, E. 2009a. Kadar Senyawa Aktif Pada Simplisia dan Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica*). *Jurnal Bioedukasi*. VII(1). 14-22
- Susetyarini, E. 2009b. Karakteristik dan Kandungan Senyawa Aktif Daun Beluntas (*Pluchea indica*). *Jurnal Berkala Penelitian Hayati*. Edisi Khusus 3A: 107-110.
- Susetyarini, E, 2010a. Uji Aktivitas Tanin Daun Beluntas (*Pluchea indica*) Terhadap Potensi Fertilisasi Spermatozoa Tikus Putih Jantan. *Laporan Penelitian*. Lemlit UMM.
- Susetyarini, E; Duran, C.R; Susilawati, T; Amin, M, 2010b. Konsentrasi Spermatozoa Tikus Putih Jantan yang Diberi Senyawa Aktif Daun Beluntas Berbagai Dosis Sebagai Sumber Belajar Mata Kuliah Reproduksi Hewan. *Prosiding*. Peran MIPA dalam Pengembangan Teknologi dan pendidikan Berkarakter menuju Bangsa Mandiri), ISBN: 978-602-97895-1-5
- Susetyarini, E, 2011a. *Khasiat Beluntas Sebagai Antifertilitas (Uji pre-klinis)*. UMM Press. Malang
- Susetyarini, E, 2011b. Aktivitas dan Keamanan Senyawa Aktif Daun Beluntas Sebagai Antifertilitas Serta Pemanfaatannya Sebagai Buku Antifertilitas. *Disertasi*. Pasca UM. Malang
- Susetyarini, E dan Wahyuni, S, 2008. Pengembangan Senyawa Aktif Daun Beluntas untuk Kontrasepsi Per Oral Sebagai Upaya Pengembangan Bahan Antifertilitas. *Laporan Penelitian*. Lemlit. UMM
- Soediro Soetarno, Kosasih, 2007. Abstrak Teknologi Fertilisasi in Vitro dalam Upaya Meningkatkan Populasi ternak produksi Sel Oviduk dan serum Domba. (<http://www.dikti.org/p3m/abstrak/HB/Ringkasan/Hb/Doc>). Diakses 17 Pebruari 2007.
- Setiawan, 1999. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Trubus Agriwidya. Bogor.
- Steel, R.G.D and J.H. Torrie. 1990. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. 2 nd ed. Mc. Graw-Hill International Book Co. Singapore.
- Triono Soedoro, 2007. Riset Kesehatan Dasar, Peluang dan Tantangannya. *Makalah Seminar BSS*. Unibraw Malang.
- Wahyuni, S dan Susetyarini, E. 2007. Aktivitas Senyawa Aktif Daun Beluntas Sebagai Antispermatojenik. *Laporan Penelitian*. Lemlit. UMM