

Kesan *Gynura procumbens* terhadap Integriti DNA dan Kualiti Sperma Mencit (Effects of *Gynura procumbens* on DNA Integrity and Sperm Quality of Mice)

EMYNURSHIELA ANUAR, UMARQAYUM ABU BAKAR & MAHANEM MAT NOOR*

ABSTRAK

Masalah kesuburan disebabkan oleh faktor kelelakan semakin meningkat dan setakat ini belum ada rawatan yang berjaya menyelesaikan masalah ini. *Gynura procumbens* adalah antara herba yang dikatakan berpotensi merawat masalah ini. Pengambilan *G. procumbens* sebagai diet telah didapati meningkatkan bilangan dan motiliti sperma, namun kesan *G. procumbens* terhadap integriti DNA sperma masih tidak diketahui. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk mengenal pasti kesan tindakan ekstrak *G. procumbens* terhadap integriti DNA dan kualiti sperma mencit jantan. Empat kumpulan mencit diberikan suapan paksa ekstrak *G. procumbens* (100, 200 dan 300 mg/mL) dan air suling selama 28 hari berturut-turut. Keputusan kajian menunjukkan ciri-ciri DNA nukleus sperma adalah normal dan nilai peratusan DNA utuh melebihi 92% pada semua kumpulan. Bilangan sperma bagi kesemua mencit yang menerima rawatan *G. procumbens* menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan (8.14 ± 1.06) $\times 10^6$ dan kumpulan 300 mg/mL menunjukkan bacaan bilangan sperma tertinggi (16.54 ± 3.2) $\times 10^6$. Kumpulan kepekatan 300 mg/mL ini turut mencatatkan peratus jumlah pergerakan progresif sperma yang paling tinggi iaitu sebanyak 49.52% berbanding 27.7% bagi kumpulan kawalan serta menunjukkan peringkat perkembangan sel spermatogen yang lengkap dan teratur. Secara kesimpulannya, kajian ini mendapati bahawa ekstrak *G. procumbens* tidak merosakkan DNA sperma serta meningkatkan beberapa parameter kesuburan mencit jantan.

Kata kunci: Asai komet; *Gynura procumbens*; integriti DNA; kualiti sperma

ABSTRACT

Issues of male infertility are growing and currently, there are no successful treatments were able to overcome it. *Gynura procumbens* is a type of herbal plant that might has a potential to treat this problem. There are previous increase in the number and motility of sperm when *G. procumbens* was consumed as a diet, however the effect of *G. procumbens* on the integrity of sperm DNA is still unknown. Therefore, this study was aimed to evaluate the effect of *G. procumbens* extract on the DNA integrity and quality of sperm from male mice. Four groups of mice were force fed with *G. procumbens* extract (100, 200 and 300 mg/mL) and distilled water for a continuously 28 days. All doses of *G. procumbens* and control showed that characteristics of the sperm DNA were normal and the percentage of intact DNA in the sperm head were above 92%. All treatments with *G. procumbens* exhibited significant ($p < 0.05$) increase in the number of sperm count compared to control, (8.14 ± 1.06) $\times 10^6$ and treatment with 300 mg/mL exhibited the highest of sperm count (16.54 ± 3.2) $\times 10^6$. The percentage of progressive motility of the sperm from this group was also the highest (49.52%) compared to control (27.7%) and exhibited a complete spermatogenic cell's developmental phases. In conclusion, this study clearly demonstrated that *G. procumbens* extract did not cause DNA damage for the sperm and a few male fertility parameters were improved.

Keywords: Comet assay; DNA integrity; *Gynura procumbens*; sperm quality

PENDAHULUAN

Sekitar 50% daripada pasangan yang sudah berkahwin berhadapan dengan masalah kesuburan disebabkan oleh faktor daripada pihak lelaki dan 40-60% masalah kesuburan lelaki berpunca daripada parameter sperma yang abnormal seperti pengurangan bilangan sperma, penurunan motiliti dan kualiti morfologi sperma (Nor-Raidah & Mahanem 2015). Setakat ini belum ada rawatan yang berjaya menyelesaikan masalah kesuburan lelaki (Hammadeh et al. 2001). Rawatan moden sedia ada untuk masalah kesuburan lelaki seperti Teknologi Reproduksi Berbantu (ART) pula memerlukan kos yang

tinggi tetapi peluang untuk mendapatkan anak adalah rendah serta mendatangkan kesan sampingan (Wald & Thornton 2007).

Penggunaan tumbuhan herba tradisi telah diamalkan sejak dahulu untuk mengubati pelbagai penyakit termasuklah masalah kesuburan lelaki. Penggunaan herba seperti *Butea superba*, *Curculigo orchoides*, *Eurycoma longifolia*, *Mucuna pruriens*, *Tribulus terrestris* dan *Gynura procumbens* dikatakan berpotensi meningkatkan parameter kesuburan seperti bilangan dan motiliti sperma, aras testosteron dan libido (Khaidatul Akmar & Mahanem 2016; Chauhan et al. 2014).

Gynura procumbens secara khususnya adalah antara herba yang berpotensi merawat masalah kesuburan lelaki (Abdul Razak et al. 2017). Kajian oleh Mahanem dan Radzuan (2012) menunjukkan *G. procumbens* berpotensi membaiki parameter kesuburan tikus jantan teraruh diabetes melalui peningkatan terhadap libido, bilangan dan motiliti sperma. *G. procumbens* juga meningkatkan ketebalan sel epitelium germa dan menunjukkan peringkat perkembangan sel spermatogenik yang lengkap dan teratur (Khaidatul Akmar & Mahanem 2016).

Kajian yang lepas banyak menerangkan berkenaan kesan *G. procumbens* terhadap kesuburan (Khaidatul Akmar & Mahanem 2016; Mahanem & Radzuan 2012; Pusparanee et al. 2016), namun tiada kajian berkenaan kesan *G. procumbens* terhadap integriti DNA sperma. DNA sperma yang rosak boleh menjejaskan proses perkembangan embrio walaupun selepas berlakunya proses persenyawaan (Hashim et al. 2016) dan boleh menyebabkan keguguran kandungan (Meseguer et al. 2011). Benchaib et al. (2007) pula menyatakan individu subur mempunyai serpihan DNA yang rendah berbanding individu tidak subur.

Justeru, kajian ini bertujuan untuk mengenal pasti kesan tindakan *G. procumbens* terhadap integriti DNA dan kualiti sperma mencit jantan.

BAHAN DAN KAEDAH

PENYEDIAAN EKSTRAK MENTAH *GYNURA PROCUMBENS*

Daun *G. procumbens* dikeringkan di dalam oven bersuhu 65°C selama 72 jam dan kemudiannya dikisar halus menjadi serbuk. Serbuk daun yang telah dikisar dicampurkan dengan nisbah 1:1 dengan air suling. Campuran dipanaskan selama 10 min sehingga mendidih. Ekstrak yang telah dipanaskan dituras menggunakan kain kasa untuk menghasilkan ekstrak dengan kepekatan 500 mg/mL. Pencairan dilakukan untuk menghasilkan ekstrak dengan kepekatan 300, 200 dan 100 mg/mL (Juarez et al. 2004).

HAIWAN KAJIAN

Mencit putih jantan (strain HSD) berumur enam minggu diperolehi dari Rumah Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia. Mencit dipelihara di dalam sangkar mengikut keadaan piawaian makmal iaitu 12 jam pencahayaan dan 12 jam gelap serta diberi makan dan minum secara *ad libitum* (Wang et al. 1996). Kesihatan haiwan sentiasa dipantau dan dikawal rapi sepanjang tempoh kajian dijalankan. Sebanyak 32 ekor mencit terlibat dalam kajian ini yang dibahagikan kepada empat kumpulan ($n=8$). Kumpulan pertama diberi air suling sebagai kawalan dan 3 kumpulan lain diberi ekstrak daun *G. procumbens* pada kepekatan berbeza iaitu 100, 200 dan 300 mg/mL. Semua perlakuan diberi secara suap paksa sekali sehari sekitar 10:00-11:00 pagi selama 28 hari berturut-turut. Pada hari ke-29, mencit dikorbankan untuk analisis integriti DNA sperma dan parameter kesuburan.

ANALISIS KUALITI SPERMA

Epididimis kauda diasingkan daripada mencit dan dimasukkan ke dalam 15 mL larutan Biggers, Whitten and Whittingham (BWW) (Biggers et al. 1971) dan kemudiannya dipotong berulang kali menggunakan gunting bedah. Potongan epididimis kauda kemudiannya dieram dalam inkubator 5% CO₂ selama 30 minit pada suhu 37°C untuk membolehkan sperma berenang di dalam medium (Yan et al. 2006). Bilangan dan motiliti sperma ditentukan mengikut kaedah dan kriteria garis panduan World Health Organization (WHO 2010) menggunakan hemositometer.

ANALISIS INTEGRITI DNA SPERMA

Sebanyak 100 µL 1% agaros bertakat lebur normal (NMA) dititiskan di atas permukaan slaid berfros sepenuhnya. Sisip kaca diletakkan sebelum agaros itu membeku untuk menghasilkan lapisan agaros pertama. Slaid itu kemudiannya dibiarkan pada permukaan ais selama 10-15 min untuk agaros membeku. Setelah agaros membeku sepenuhnya, sisip kaca ditanggalkan secara berhati-hati tanpa merosakkan agaros tersebut.

Campuran sel-sperma agaros yang bernisbah 10 µL sampel + 75 µL 0.5% agaros bertakat lebur rendah (LMA) dititiskan di atas permukaan lapisan agaros pertama (Hughes et al. 1997). Sisip kaca diletakkan sebelum lapisan sel-sperma agaros membeku. Slaid itu kemudiannya dibiarkan pada permukaan ais selama 10-15 min untuk agaros tersebut membeku. Setelah lapisan agaros kedua membeku, sisip kaca ditanggalkan secara berhati-hati tanpa merosakkan lapisan agaros.

Slaid yang telah disediakan dipindahkan ke dalam bekas berpenimbal lisis pertama (Haines et al. 2002) dan dieram selama satu jam pada suhu 37°C. Setelah itu, slaid tadi dipindahkan ke dalam bekas berpenimbal lisis kedua (mengandungi Proteinase-K) selama dua jam 30 min pada suhu 37°C. Pengeraman bagi lisis pertama dan kedua dilakukan dalam keadaan gelap. Seterusnya slaid dipindahkan ke dalam bekas berisi air suling dan direndam selama 20 min, langkah terakhir ini diulangi sebanyak tiga kali bagi tujuan pembilasan.

Slaid kemudiannya direndam di dalam penimbal elektroforesis selama 20 min untuk membolehkan DNA mengendur. Seterusnya, elektroforesis dijalankan pada 25 V, 300 mA selama 20 min. Selepas tempoh elektroforesis tamat, slaid tadi segera dipindahkan ke dalam penimbal neutralisasi dan direndam selama 10 min. Rendaman dengan penimbal neutralisasi baru diulangi sebanyak 2 kali untuk membilas detergen. Kemudian, slaid dikeluarkan dan dibiarkan kering pada suhu bilik sebelum diwarnakan dengan etidium bromida (EtBr) 50 µg/mL. Langkah pewarnaan dilakukan tanpa kehadiran cahaya. Slaid yang telah diwarnakan disimpan di dalam bekas kalis cahaya yang dilitupi dengan aluminium foil (Haines et al. 2002).

Seterusnya slaid dicerap di bawah mikroskop berpendaflor (Olympus BX 51, Jepun) dan gambar dianalisis menggunakan perisian TriTek CometScore™ Freeware v1.5 (Kale et al. 2006). Maklumat yang diperolehi

daripada analisis ini ialah peratus DNA utuh dalam kepala sperma (Haines et al. 2002).

ANALISIS HISTOLOGI TESTIS

Organ testis yang telah dikeluarkan daripada mencit dibersihkan dan ditetapkan dalam larutan Bouin selama 24 jam (Hughes et al. 1997). Sampel kemudiannya melalui proses penyahairan dengan cara merendam sampel di dalam beberapa siri larutan alkohol dan direndam dengan toluen semalaman. Seterusnya lilin parafin dibiarkan meresap ke dalam sampel organ sebelum sampel dihiris pada ketebalan 5 μm menggunakan alat mikrotom *American Optical* dan diwarnakan dengan menggunakan hematoksilin dan eosin mengikut kaedah (Sasaki et al. 1998). Slaid keratan rentas testis diperhatikan di bawah mikroskop cahaya.

ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS versi 15.0. Perbandingan min parameter yang dikaji dilakukan menggunakan analisis varian satu hala (ANOVA) dengan nilai $p < 0.05$ dianggap signifikan.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

ANALISIS INTEGRITI DNA SPERMA

Rajah 1 menunjukkan DNA sperma mencit kawalan dan kumpulan perlakuan *G. procumbens* yang telah melalui asai komet berkali-kali. Berdasarkan pemerhatian di bawah mikroskop cahaya, DNA sperma didapati normal kerana tiada struktur komet terbentuk bagi setiap kumpulan kawalan dan perlakuan. Pemerhatian ini diperkukuhkan lagi dengan imej DNA sperma yang dianalisis dengan menggunakan perisian TriTek CometScore™ Freeware v1.5. Perisian ini menunjukkan nilai peratusan DNA utuh sperma yang tinggi bagi kesemua kumpulan mencit

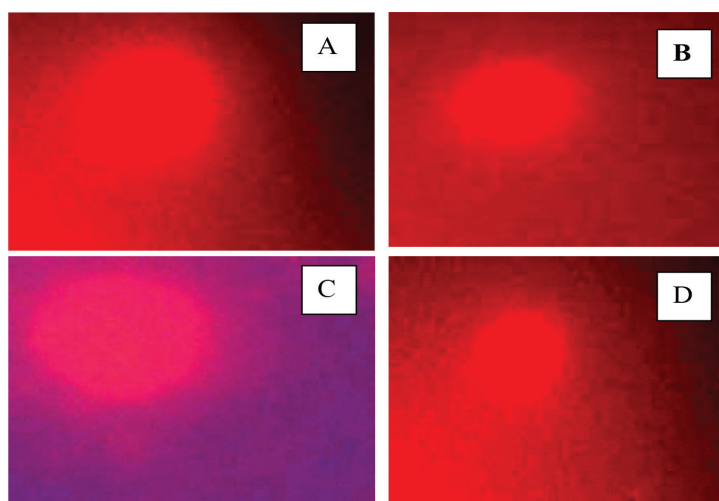
kawalan dan perlakuan (Rajah 2). Data ini kemudiannya dianalisis menggunakan perisian statistik SPSS. Hasil analisis purata peratusan DNA utuh sperma perlakuan kepekatan rendah 100 mg/mL adalah 92.454 ± 0.0872 , sederhana 200 mg/mL (92.473 ± 0.0570) dan tinggi 300 mg/mL (92.493 ± 0.0474). Kesemuanya menunjukkan perbezaan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) berbanding purata DNA utuh bagi mencit kawalan (92.515 ± 0.0553).

Keputusan daripada asai komet dan peratusan DNA utuh sperma mendapati ekstrak *G. procumbens* tidak merosakkan DNA sperma mencit pada ketiga-tiga kepekatan rawatan apabila tiada struktur ekor komet dicerap pada analisis asai komet serta peratus DNA utuh yang melebihi 90%. Kajian asai komet terdahulu mendapati bahawa terdapat herba yang mampu merosakkan DNA sperma dan menurunkan parameter kesuburan lelaki seperti *Abrus precatorius* (Jahan et al. 2009) dan *Ruta graveolens* (Halvaei et al. 2012).

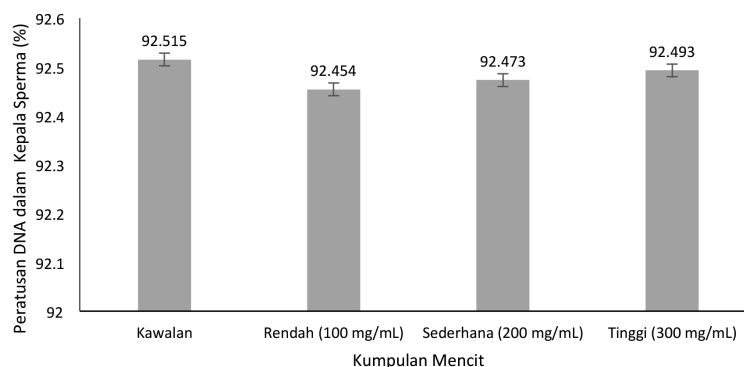
ANALISIS KUALITI SPERMA

Bagi penilaian aspek kualiti sperma, parameter yang digunakan ialah bilangan sperma dan gred motiliti sperma. Rajah 3 menunjukkan perbandingan bilangan sperma bagi mencit kawalan serta mencit yang diperlakukan dengan kepekatan rendah, sederhana dan tinggi *G. procumbens*. Perlakuan ketiga-tiga kepekatan telah meningkatkan bilangan sperma mencit secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan. Bilangan sperma mencit kumpulan kepekatan tertinggi menunjukkan peningkatan bilangan sperma yang paling ketara iaitu $(16.54 \pm 3.20) \times 10^6$ sperma berbanding kawalan $(8.136 \pm 1.059) \times 10^6$ sperma.

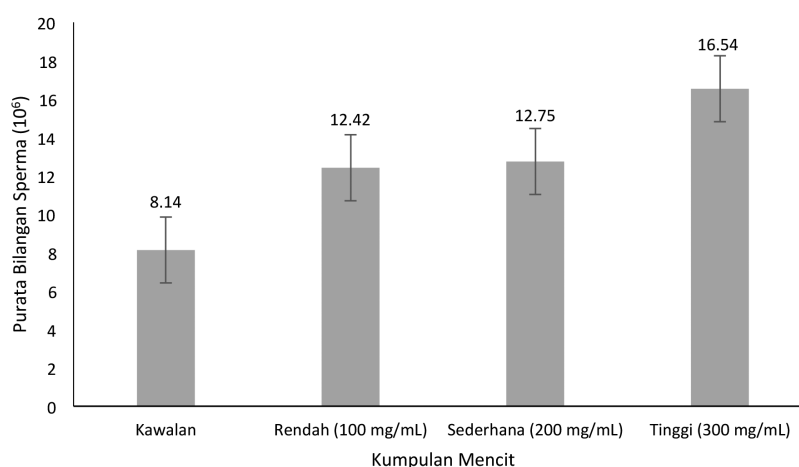
Peningkatan bilangan sperma pada ketiga-tiga kepekatan perlakuan *G. procumbens* berbanding kawalan adalah berkemungkinan disebabkan oleh dua faktor. Faktor pertama ialah kemungkinan terdapat sebatian di dalam ekstrak *G. procumbens* yang mempunyai kesan tindakan yang serupa dengan hormon testosteron yang



RAJAH 1. DNA sperma mencit yang dicerap di bawah mikroskop cahaya: (A) kumpulan kawalan, (B) Kumpulan kepekatan rendah, (C) Kumpulan kepekatan sederhana dan (D) Kumpulan kepekatan tinggi *G. procumbens*



RAJAH 2. Purata peratusan DNA dalam kepala sperma bagi kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan *G. procumbens* dos rendah, sederhana dan tinggi



RAJAH 3. Purata bilangan sperma bagi kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan *G. procumbens* kepekatan rendah, sederhana dan tinggi

dapat meningkatkan penghasilan sperma (Manosroi et al. 2006). Faktor kedua ialah kemungkinan terdapat sebatian di dalam ekstrak *G. procumbens* yang mengaktifkan enzim androgenik seperti $\Delta 5,3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ($\Delta 5,3\beta$ -HSD) and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) yang merangsang perembesan hormon testosteron dan kemudiannya meningkatkan aktiviti spermatogenesis (Pusparanee et al. 2016). Kajian lepas menunjukkan ekstrak *G. procumbens* mengandungi sifat antioksidan berdasarkan kepada kandungan flavonoid dan sebatian fenol yang tinggi di dalamnya seperti kaempferol, rutin dan quercetin (Rosidah et al. 2008). Quercetin pula dilaporkan meningkatkan bilangan, viabiliti dan motiliti sperma melalui pengurangan spesies oksigen teraktif (ROS) (Khaki et al. 2009) yang mempunyai kesan buruk terhadap spermatogenesis (Ko et al. 2014). Aktiviti spermatogenesis yang aktif akan meningkatkan bilangan sperma yang terhasil dan sebaliknya (Ambiye et al. 2013).

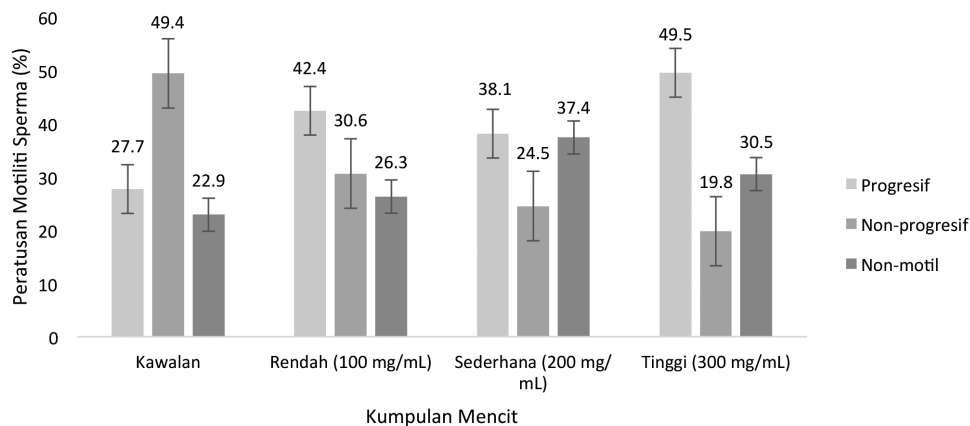
Parameter kualiti sperma yang seterusnya adalah motiliti sperma. Motiliti atau progresi sperma merujuk kepada keaktifan pergerakan sperma semasa cerapan (Mahanem & Radzuan 2012). Ada tiga kategori motiliti sperma berdasarkan kepada garis panduan

WHO (2010), iaitu pergerakan progresif, non-progresif dan non-motil. Keputusan kajian ditunjukkan pada Rajah 4. Kemampuan pergerakan sperma kategori progresif meningkat mengikut peningkatan kepekatan bagi ketiga-tiga kumpulan perlakuan *G. procumbens* berbanding kumpulan kawalan (27.70%) dengan peratusan tertinggi iaitu 49.52%, 42.37% dan 38.09%.

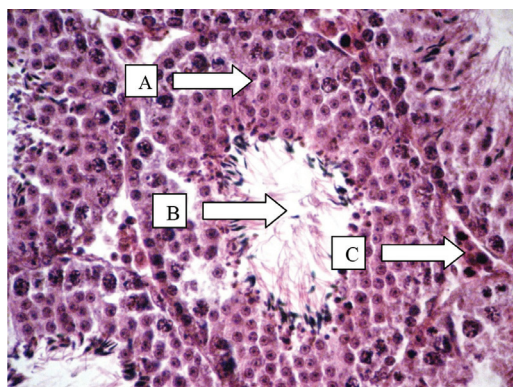
Peningkatan terhadap motiliti sperma pada kumpulan perlakuan berkemungkinan disebabkan oleh pengoptimuman pada fungsi mitokondria yang terdapat di bahagian tengah ekor sperma (Piomboni et al. 2012) yang dipengaruhi oleh sebatian yang terdapat dalam *G. procumbens*. Mitokondria adalah organel yang berperanan utama dalam menjana tenaga adenosina trifosfat (ATP) untuk ekor sperma bergerak dan berenang mensenyawakan oosit secara semula jadi (Hashim et al. 2016). Menurut Piomboni et al. (2012), ketidakfungsian mitokondria di bahagian ekor boleh merencatkan motiliti sperma.

ANALISIS HISTOLOGI TESTIS

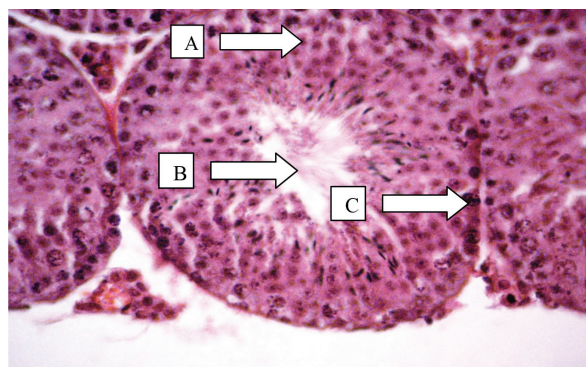
Rajah 5 hingga 8 merupakan hasil pemerhatian histologi testis mencit kawalan dan perlakuan dengan pewarnaan



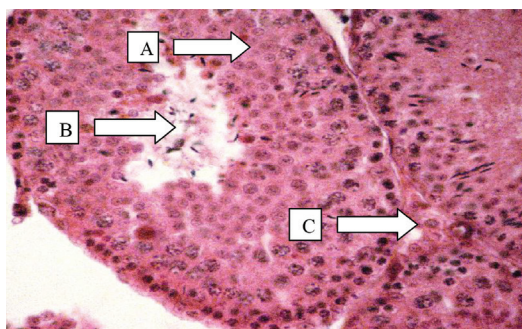
RAJAH 4. Peratusan motiliti sperma mengikut kategori bagi kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan *G. procumbens* kepekatan rendah, sederhana dan tinggi



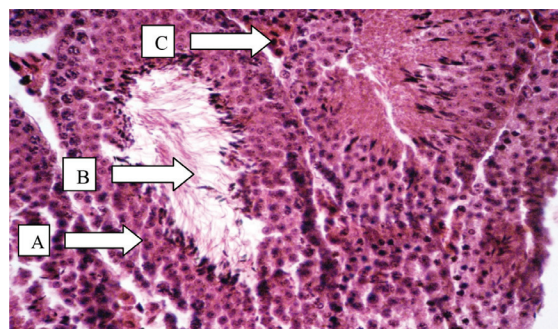
RAJAH 5. Keratan rentas testis mencit kawalan dengan pewarnaan Hematoksin dan Eosin. Lumen padat dengan sperma (A) sel-sel germinal (B) ruang lumen (C) sel leydig (400x)



RAJAH 7. Keratan rentas testis kumpulan rawatan kepekatan 200 mg/mL *G. procumbens*. Lumen padat dengan sperma (A) sel-sel germinal (B) ruang lumen (C) sel leydig (400x)



RAJAH 6. Keratan rentas testis kumpulan rawatan kepekatan 100 mg/mL *G. procumbens*. Lumen padat dengan sperma (A) sel-sel germinal (B) ruang lumen (C) sel leydig (400x)



RAJAH 8. Keratan rentas testis kumpulan rawatan kepekatan 300 mg/mL *G. procumbens*. Lumen yang paling padat dengan sperma (A) sel-sel germinal (B) ruang lumen (C) sel leydig (400x)

Hematoksin dan Eosin. Analisis histologi testis dilakukan secara kualitatif untuk melihat perbandingan struktur, bilangan dan posisi sel-sel germinal demi membuat kesimpulan tentang proses spermatogenesis. Sel-sel germinal diperhatikan tersusun secara rapat dan teratur pada testis mencit kawalan dan kumpulan perlakuan.

Bagi keratan rentas kumpulan kawalan, kepekatan rendah dan sederhana *G. procumbens*, ruang lumen testis menunjukkan spermatogenesis yang normal dan mengandungi sperma yang padat pada setiap tubul seminiferus. Manakala pemerhatian pada kumpulan rawatan kepekatan tinggi, didapati bilangan sperma lebih tinggi dan tubul seminiferus lebih padat berbanding

kumpulan lain. Kepadatan sperma di dalam lumen tubul seminiferus menunjukkan proses spermatogenesis berlaku secara aktif (Khaidatul Akmar & Mahanem 2016). Sel leydig yang terletak di antara tubul seminiferus pada kesemua mencit didapati normal dan ia adalah penting dalam penghasilan hormon testosterone (Pusparanee et al. 2016).

Peningkatan aras testosterone dikatakan boleh menjadi sebab lapisan sel epitelium germa menjadi lebih tebal, mempamerkan lumen tubul yang padat dengan sperma dan meningkatkan bilangan sel sertoli yang akhirnya menghasilkan sel-sel spermatid dan spermatozoa yang banyak dan tersusun di dalam lumen (Pusparanee et al. 2016). Kami mencadangkan bahawa penambahbaikan terhadap struktur testis oleh *G. procumbens* dalam kajian ini dipercayai disebabkan oleh terjadinya pengawalan yang baik daripada paksi hipotalamus-pituitari-gonad yang mengawal atur hormon-hormon seperti hormon pelepasan gonadotropin (GnRH), hormon perangsang folikel (FSH) dan hormon peluteinan (LH) (Pusparanee et al. 2016). Hormon-hormon ini berperanan penting dalam perkembangan tubul seminiferous, spermatogenesis dan fungsi testis yang lain (Khaidatul Akmar & Mahanem 2016).

KESIMPULAN

Rawatan dengan *G. procumbens* menunjukkan tiada ketoksikan dan kerosakan dicerap pada DNA sperma dengan pemerhatian di bawah mikroskop cahaya mendapati tiada struktur komet terbentuk bagi setiap kumpulan perlakuan. Analisis statistik turut membuktikan bahawa tiada perbezaan yang signifikan antara peratusan DNA utuh dalam kumpulan yang diberikan *G. procumbens* berbanding kumpulan kawalan. Ekstrak *G. procumbens* juga meningkatkan parameter kesuburan mencit jantan melalui peningkatan bilangan dan motiliti sperma. Kajian histologi testis turut menyokong *G. procumbens* meningkatkan kesuburan mencit jantan apabila kepadatan sperma pada lumen tubul seminiferus mencit kumpulan 300 mg/mL adalah lebih tinggi berbanding kumpulan lain. Dalam kajian ini, kepekatan tinggi *G. procumbens* 300 mg/mL adalah kepekatan optimum bagi meningkatkan parameter kesuburan mencit jantan.

PENGHARGAAN

Penulis berterima kasih kepada Fakulti Sains dan Teknologi, UKM di atas kemudahan penyelidikan yang disediakan.

RUJUKAN

Abdul Razak, R.N.H., Isa, M.L., Mat Yusof, A., Abdul Wahab, A.Y., Abdul, Muhammad, H. & Ramli, R. 2017. Animal studies on male fertility enhancing properties of plants in Malaysia: A review of the past 16 years. *J. Biotechnol. and Strategic Health Res.* 1: 17-23.

Ambiye, V.R., Langade, D., Dongre, S., Aptikar, P., Kulkarni, M. & Dongre, A. 2013. Clinical evaluation of the spermatogenic

activity of the root extract of Ashwagandha (*Withania somnifera*) in oligospermic males: A pilot study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 571420.

- Benchaib, M., Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B. & François Guerin, J. 2007. Spermdeoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility* 87(1): 93-100.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K. & Whittingham, D. 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In *Methods in Mammalian Embryology*, edited by Freeman, J.C.D. San Francisco: Wiley. pp. 86-116.
- Chauhan, N.S., Sharma, V., Dixit, V.K. & Thakur, M. 2014. A review on plants used for improvement of sexual performance and virility. *Bio.Med. Research International* 2014: 868062.
- Haines, G.A., Hendry, J.H., Daniel, C.P. & Morris, I.D. 2002. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biology of Reproduction* 67(3): 854-861.
- Halvaei, I., Reza, H., Roodsari, S. & Harat, Z.N. 2012. Acute effects of *Ruta graveolens* on sperm parameters and DNA integrity in rats. *Journal Reproduction & Infertility* 2050(3): 33-38.
- Hammadeh, M.E., Zeginiadiyov, T., Rosenbaum, P., Georg, T., Schmidt, W. & Strehler, E. 2001. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Archives of Andrology* 46(2): 99-104.
- Hashim, N., Osman, K., Ibrahim, S.F., Harun, R. & Mohamed, R.P. 2016. Kesan psikostres terhadap kerosakan DNA dan ketaknormalan titisan sitoplasma sperma manusia. *Sains Malaysiana* 45(12): 1931-1938.
- Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J. & Thompson, W. 1997. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 374(2): 261-268.
- Jahan, S., Rasool, S., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Arsahd, M. & Abbasi, A.M. 2009. Antifertility effects of ethanolic seed extract of *Abrus precatorius* on sperm production and DNA integrity in adult male mice. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(10): 809-814.
- Juarez, C.M., Cervantes, E., Cervantes, M.M. & Rodríguez, M.G. 2004. Aphrodisiac properties of *Montanoa tomentosa* aqueous crude extract in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78(1): 129-134.
- Kale, S.P., Carmichael, M.C., Harris, K. & Roy-Engel, A.M. 2006. The L1 retrotranspositional stimulation by particulate and soluble cadmium exposure is independent of the generation of DNA breaks. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 3(2): 121-128.
- Khaidatul Akmar, K. & Mahanem, M.N. 2016. Profertility and antidiabetic properties of *Gynura procumbens* on streptozotocin induced male rats. *AIP Conference Proceedings* 1784(020027): 1-6.
- Khaki, A., Nouri, M., Fathiazad, F., Ahmadi-Ashtiani, H., Rastgar, H. & Rezaadeh, S. 2009. Protective effects of quercetin on spermatogenesis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Medicinal Plants* 8(5): 118-124.
- Ko, E.Y., Sabanegh, E.S. & Agarwal, A. 2014. Male infertility testing: Reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and Sterility* 102(6): 1518-1527.

- Manosroi, A., Sanphet, K., Saowakon, S., Aritajat, S. & Manosroi, J. 2006. Effects of *Butea superba* on reproductive systems of rats. *Fitoterapia* 77(6): 435-438.
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., García, H.S., Remohí, J. & Fernandez, J.L. 2011. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility* 95(1): 124-128.
- Mahanem, M.N. & Radzuan, N.R.M. 2012. Kesan antihiperglisemia ekstrak metanol *Gynura procumbens* terhadap kesuburan dan libido tikus jantan teraruh diabetes. *Sains Malaysiana* 41(12): 1549-1556.
- Nor-Raidah, R. & Mahanem, M.N. 2015. Enhancement of fertility and libido in male sprague dawley rats following the administration of aqueous extract of *Lunasia amara*. *Malaysian Applied Biology* 44(1): 125-131.
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A. & Zara, V. 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International Journal of Andrology* 35(2): 109-124.
- Pusparanee, H., Lee, H.W., Halimah, A.S. & Mahanem, M.N. 2016. Effects of *Gynura procumbens* on sperm quality and testosterone level in streptozotocin-induced Type 1 diabetic rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(1): 22-30.
- Rosidah, Yam, M., Sadikun, A. & Asmawi, M. 2008. Antioxidant potential of *Gynura procumbens*. *Pharmaceutical Biology* 46(9): 616-625.
- Sasaki, Y. F., Saga, A., Akasaka, M., Ishibashi, S., Yoshida, K., Su, Y.Q. & Tsuda, S. 1998. Detection of *in vivo* genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs. *Mutation Research* 419(1-3): 13-20.
- Wald, T.V. & Thornton, K. 2007. Assisted reproductive technology. *Reproductive Endocrinology and Infertility* 109(4): 967-977.
- Wang, H.X., Ng, T.B., Liu, W.K., Ooi, V.E.C. & Chang, S.T. 1996. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28(5): 601-607.
- World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.
- Yan, J., Feng, H.L., Chen, Z.J., Hu, J., Gao, X. & Qin, Y. 2006. Influence of swim-up time on the ratio of X- and Y-bearing spermatozoa. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 129(2): 150-154.

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
46300 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: mahanem@ukm.edu.my

Diserahkan: 14 September 2017

Diterima: 28 Mei 2018