

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN DADAP AYAM (*Erythrina variegata* L.) TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN GALUR WISTAR (*Rattus norvegicus*)

Stefani Tjiphanata¹⁾, Edwin De Queljoe¹⁾, Sri Sudewi¹⁾
¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Spermatozoa are a sperm cell that has flagella and produced in spermatogenesis. To fertilize the ovum, the spermatozoa have to have a good quality. The Quality of spermatozoa is one of the most important elements to evaluate the male fertility. This study was being held to determine the effect of applying ethanol extract of Dadap leaf against the quality of white male Wistar rats (*Rattus norvegicus*)'s spermatozoa. This study is using a complete random design (CRD) approached, using 24 white male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) divided into several groups where the group 1 as a non-treatment control group, while the group 2, 3 and 4 as the treatment groups with dosage of 200 mg, 400 mg and 800 mg, respectively. Treatment is given by oral with 1 cc once a day for 50 days follows the cycle of spermatogenesis. The observed variable included the quantity, motility and morphology of spermatozoa. The results of this study showed that the ethanol extract of Dadap leaf could reduce the quality of spermatozoa in terms of quantity, motility and morphology while based on statistic, the ethanol extract of Dadap leaf can only reduce the quality of spermatozoa in mophology aspect significantly.

Keywords: Dadap leaf (*Erythrina variegata* L.), spermatozoa, white male wistar rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRAK

Spermatozoa adalah sel kelamin jantan yang memiliki bulu cambuk dan dihasilkan dalam spermatogenesis. Untuk dapat membuahi sel telur, syarat yang harus dipenuhi spermatozoa adalah bahwa kualitas spermatozoa harus baik. Kualitas spermatozoa merupakan salah satu unsur penting untuk evaluasi kesuburan pria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun dadap ayam terhadap kualitas spermatozoa tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan menggunakan 24 ekor tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang dibagi atas beberapa kelompok dimana kelompok 1 sebagai kelompok kontrol tanpa perlakuan, kelompok 2, 3 dan 4 sebagai kelompok perlakuan dengan dosis secara berturut-turut 200 mg, 400 mg dan 800 mg. Perlakuan diberikan secara oral sekali sehari sebanyak 1 cc selama 50 hari sesuai siklus spermatogenesis. Variabel yang diamati meliputi jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dadap ayam dapat menurunkan kualitas spermatozoa dari segi kuantitas, motilitas serta morfologi spermatozoa sedangkan berdasarkan statistik ekstrak daun dadap ayam hanya dapat menurunkan kualitas spermatozoa dalam aspek morfologi spermatozoa secara signifikan.

Kata Kunci : Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.), spermatozoa, tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*)

PENDAHULUAN

Spermatozoa merupakan sel kelamin jantan yang memiliki bulu cambuk dan dihasilkan dalam spermatogenesis. Proses pematangan spermatozoa sebagian besar berlangsung di epididimis melalui serangkaian perubahan morfologi dan fungsi sehingga dihasilkan spermatozoa yang motil dan fertil yang dapat membuahi sel telur. Untuk dapat membuahi sel telur, syarat yang harus dipenuhi spermatozoa adalah bahwa kualitas spermatozoa harus baik. Kualitas spermatozoa merupakan salah satu unsur penting untuk evaluasi kesuburan pria (Soehadi *et al.*, 1983).

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengendalikan kesuburan pria yaitu melalui penggunaan bahan alam dari beberapa tumbuhan yang mempunyai bahan aktif yang bersifat antifertilitas. Pemanfaatan bahan alam dari tumbuhan untuk pengobatan tradisional memiliki kelebihan selain murah dan mudah didapat, juga memiliki efek samping yang relatif lebih kecil dibandingkan dengan bahan kimia atau sintetik (Warara *et al.*, 2016).

Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.) merupakan tumbuhan termasuk famili Leguminosae, tersebar luas di Indonesia. Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.) adalah salah satu tumbuhan yang telah lama digunakan masyarakat Indonesia dalam pengobatan tradisional, diantaranya sebagai antimalaria, antidiare dan antipiretik (Hanum *et al.*, 1997). Bagian tumbuhan yang digunakan dalam pengobatan adalah kulit batang, daun, akar, dan biji. Secara kimia tumbuhan ini

mengandung senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, dan resin. Ditinjau dari zat aktif yang terdapat dalam Dadap Ayam, menurut penelitian Susetyarini (2009) dilaporkan bahwa senyawa-senyawa seperti alkaloid, flavonoid, dan tanin dapat mempengaruhi fertilitas tikus jantan. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Herlina *et al.* (2008), dilaporkan bahwa ekstrak metanol dari daun Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.) yang dilakukan secara *in vitro* pada dosis $0,25 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ berpotensi sebagai antifertilitas karena dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa tikus putih jantan yang meliputi penurunan motilitas, viabilitas serta meningkatkan abnormalitas morfologi.

Informasi mengenai khasiat Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.) sebagai antifertilitas secara tradisional masih sangat terbatas dan belum banyak diteliti di Indonesia. Hal ini kemudian yang melatarbelakangi peneliti untuk melakukan penelitian yang belum dilakukan oleh peneliti sebelumnya yaitu mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.) terhadap kualitas spermatozoa tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dilaksanakan pada priode Agustus 2016 sampai Januari 2017 di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Penelitian Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan

Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi Manado. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus wistar berumur 2-3 bulan dengan bobot rata-rata 150-200 gram.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik (ADAM KERN), ayakan mesh 200, oven (Ecocell), gelas ukur 1000 mL (*Pyrex*), *beaker glass* 500 mL (*Pyrex*), labu ukur 100 mL, batang pengaduk, corong, pipet tetes, alat sonikasi (Janres ultra 8060D-H), kertas saring, sarung tangan lateks, masker (*Sensi Mask*), botol sampel, gunting, blender (Philips), cawan petri (*Pyrex*), kandang, mikroskop elektron, dispo 5 cc (One Med), hemasitometer, sonde oral, seperangkat alat bedah, *hot plate*, *object glass* dan *cover glass*.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) 24 ekor, daun Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.), etanol 96%, metanol, aquadest, *aluminium foil*, *carboxymethyl cellulose* (CMC) 1%, pakan tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*), formalin 35%, safranin 1%, eter, *natrium bikarbonat* (NaHCO_3).

Ekstraksi

Sebanyak 450 gram serbuk daun Dadap Ayam ditimbang dan dimasukkan dalam *beaker glass* kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan cara serbuk simplisia ditambahkan pelarut etanol 96% hingga volumenya melewati batas tinggi sampel di dalam beaker gelas sehingga sampel terendam sempurna dengan perbandingan 1:4 (w/v) kemudian diaduk hingga homogen, setelah itu ditutup dengan *aluminium foil* dan

dibiarkan selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari sampel yang direndam tersebut disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan oven pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental.

Tahap Perlakuan

Perlakuan pemberian ekstrak daun Dadap Ayam dilakukan setelah hewan percobaan mengalami aklimatisasi selama 1 minggu. Setelah itu dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus wistar. Kelompok perlakuan yang digunakan adalah kelompok kontrol (tidak diberi ekstrak) dan kelompok yang diberi ekstrak daun Dadap Ayam (*Erythrina variegata* L.) dengan 3 dosis yang berbeda-beda yaitu 200 mg, 400 mg, dan 800 mg (Faktor konversi dosis manusia ke tikus = 0,018). Ekstrak daun Dadap Ayam diberikan melalui sonde lambung. Pemberian dilakukan selama 50 hari sesuai siklus spermatogenesis.

Pengambilan Sperma

Setelah 50 hari, masing-masing hewan uji dibius menggunakan eter, kemudian di bedah dan diambil bagian *cauda epididimis* untuk mendapatkan sperma. Setelah itu *cauda epididimis* diletakkan pada *objek glass*, kemudian diurut/diplirit hingga sperma keluar. Sperma yang diambil kemudian dinilai jumlah, motilitas serta morfologi spermatozoa.

Pengukuran Parameter

Perhitungan jumlah spermatozoa dilakukan dengan cara memipet sperma dengan menggunakan pipet khusus eritrosit sampai skala 0,5. Kemudian sperma diencerkan dengan larutan

pengencer sampai tanda 101 (Pengenceran 200x) lalu dikocok sampai homogen. Larutan sperma dikocok dan di buang 3 tetes kemudian ditetaskan pada kamar hitung yang sudah ditutup dengan menggunakan *cover glass*. Sediaan tersebut dibiarkan sebentar agar sel-sel spermatozoa mengendap, sehingga memudahkan perhitungan. Pemeriksaan dilakukan dengan 5 lapang pandang pada kamar hitung dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x (WHO, 2010).

Menurut Soehadi *et al.* (1987), perhitungan jumlah spermatozoa dilakukan dengan cara mengalikan jumlah sel spermatozoa yang terhitung dalam 5 kotak dengan pengenceran (200x) dan dikalikan dengan faktor *Neubauer*.

$$\text{Konsentrasi spermatozoa} = \frac{N \times 200 \times 10000}{10000}$$

Dimana N adalah jumlah sel spermatozoa yang terhitung dalam 5 kotak, 200 adalah pengenceran dan 10000 adalah faktor *Neubauer* (Soehadi *et al.*, 1987).

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara meneteskan sediaan sperma pada object glass dan ditutup dengan cover glass, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara menghitung persentase spermatozoa kategori progresif dari 100 spermatozoa. Pengamatan motilitas perlu dilakukan pertama kali karena motilitas spermatozoa mudah

mengalami penurunan pada saat berada diluar tubuh (WHO, 2010).

Pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan dengan cara O. Steeno. Sperma diletakkan pada object glass kemudian di buat sediaan hapusan lalu dikeringkan. Kemudian difiksasi dengan larutan metanol selama 5 menit dan dikeringkan diudara. Setelah itu dicelupkan ke dalam larutan safranin 1% selama 5 menit dan dibilas dengan air dan dikeringkan (Soehadi *et al.*, 1987). Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Kemudian dari 100 spermatozoa, dihitung persentase spermatozoa yang memiliki morfologi normal. Pengamatan dilakukan pada kelainan bentuk atau abnormalitas spermatozoa yang meliputi abnormalitas pada bagian kepala dan ekor (midpiece, principal piece dan end piece) (WHO, 2010).

Analisis data

Data yang diperoleh dari jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan parametrik *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji BNT untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah/Konsentrasi Spermatozoa

Didapatkan hasil rerata konsentrasi spermatozoa, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata Konsentrasi Spermatozoa

Kelompok	Konsentrasi Spermatozoa x10 ⁶ Juta/mL
Kontrol	196,75
Dosis rendah (200 mg)	146

Dosis sedang (400 mg)	141
Dosis tinggi (800 mg)	138,75

Pada Tabel 1. Dapat dilihat terjadi penurunan konsentrasi spermatozoa pada semua kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol. Penurunan konsentrasi spermatozoa diduga disebabkan karena adanya kandungan zat aktif tanin. Menurut Susetyarini (2009), tanin dapat menghambat perkembangan spermatid menjadi spermatozoa sehingga spermatozoa yang dihasilkan menjadi berkurang. Namun berdasarkan analisis statistik yang diuji menggunakan

parametrik *One Way Anova* penurunan konsentrasi spermatozoa yang terjadi belum menunjukkan perbedaan yang signifikan pada pemberian ekstrak daun Dadap Ayam yang dibuktikan dengan nilai Sig 0,611 ($p \geq 0,05$). Hal ini juga diduga dikarenakan dosis pemberian belum cukup untuk menyebabkan penurunan konsentrasi spermatozoa secara signifikan.

Motilitas Spermatozoa

Didapatkan hasil rerata motilitas spermatozoa, dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rerata Motilitas Spermatozoa

Kelompok	Motilitas Spermatozoa normal (%)
Kontrol	65
Dosis rendah (200 mg)	40
Dosis sedang (400 mg)	32,5
Dosis tinggi (800 mg)	37,5

Pada Tabel 2. Dapat dilihat terjadi penurunan motilitas spermatozoa pada semua kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol. Penurunan motilitas spermatozoa akibat pemberian ekstrak daun Dadap Ayam ini diduga disebabkan oleh adanya zat aktif yang bersifat sitotoksik atau mempunyai efek spermatisida terhadap spermatozoa. Dalam hal ini diduga zat alkaloid yang terdapat pada daun Dadap Ayam yang menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa melalui efek sitotoksik ini.

Namun belum teridentifikasi secara pasti jenis golongan alkaloid yang terkandung dalam daun Dadap Ayam. Menurut Ganong (2011), alkaloid dapat menurunkan motilitas spermatozoa, karena alkaloid dapat mengganggu aktivitas enzim ATP-ase yang ada dalam membran sel spermatozoa pada bagian tengah ekor. ATP-ase tersebut berfungsi mempertahankan homeostatis internal untuk ion natrium dan kalium. Jika aktivitas ATP-ase terganggu, maka homeostatis ion natrium dan kalium akan

terganggu. Apabila ion natrium dan kalium terganggu maka motilitas spermatozoa juga akan terganggu karena motilitas spermatozoa sangat bergantung pada komposisi kalium dan natrium (Gradi dan Nelson, 1972).

Selain senyawa alkaloid, senyawa flavonoid dan tanin yang terdapat pada daun Dadap Ayam juga dapat menurunkan motilitas spermatozoa. Menurut Cambie dan Brewis (1995), Flavonoid mampu merangsang pembentukan estrogen yang dapat meningkatkan kadar estrogen. Kadar estrogen akan memberikan umpan balik negatif ke hipofisis anterior, yaitu tidak melepaskan FSH dan LH. Penurunan kadar LH menyebabkan gangguan terhadap sekresi testosteron oleh sel leydig. Dengan adanya gangguan terhadap sekresi testosteron maka motilitas spermatozoa menjadi terganggu. Dan senyawa tanin dapat mengganggu aktivitas protein dinein yang merupakan salah satu protein yang terdapat pada ekor sperma, yang akan menurunkan motilitas spermatozoa. Protein ini penting karena mempunyai aktivitas ATP-ase yang berfungsi mempertahankan homeostatis internal untuk ion natrium dan kalium. Selain itu tanin juga bersifat toksik pada spermatozoa. Tanin bersifat astringent yang menyebabkan terjadinya pengerutan

sel, sehingga dapat berpengaruh terhadap permeabilitas membran sel sperma (Merck Indeks, 1985). Dengan adanya sifat astringen ini, maka tannin yang ada dalam daun dadap ayam tersebut dapat menyebabkan transportasi zat makanan/nutrisi melalui membran terganggu. Robertis dan Robertis (1979) melaporkan, bahwa permeabilitas membran erat kaitannya dengan transport nutrisi yang diperlukan pada metabolisme sel dalam menghasilkan energi sehingga apabila transpor nutrisi terganggu maka spermatozoa akan kekurangan energi. Energi yang berkurang ini dapat menurunkan motilitas spermatozoa

Namun berdasarkan hasil analisis statistik yang diuji menggunakan parametrik *One Way Anova* penurunan motilitas spermatozoa yang terjadi belum menunjukkan perbedaan yang signifikan pada pemberian ekstrak daun Dadap Ayam yang dibuktikan dengan nilai Sig 0,141 ($p \geq 0,05$) . Hal ini diduga karena dosis pemberian belum cukup untuk menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa secara signifikan.

Morfologi Spermatozoa

Didapatkan hasil rerata morfologi spermatozoa, dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rerata Morfologi Spermatozoa

Kelompok	Morfologi spermatozoa normal (%)
Kontrol	77,5
Dosis rendah (200 mg)	65
Dosis sedang (400 mg)	42,5
Dosis tinggi (800 mg)	35

Pada Tabel 3. Dapat dilihat terjadi penurunan persentase morfologi spermatozoa normal pada semua kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol. Dan hasil analisis uji Anova menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun Dadap Ayam dapat menurunkan morfologi spermatozoa normal secara signifikan (bermakna) yang dibuktikan dengan nilai $p = 0,037$ ($p \geq 0,05$). Sehingga dilanjutkan dengan uji BNT terlihat bahwa perbedaan yang signifikan hanya terjadi di antara perlakuan 2 dan perlakuan 3 terhadap kontrol ($p \geq 0,05$), sedangkan antar perlakuan-perlakuan yang diujikan tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan 2 dan perlakuan 3 cukup baik secara statistik dalam menurunkan persentase morfologi spermatozoa normal. Namun berdasarkan Tabel 3 terlihat rerata morfologi spermatozoa normal pada kelompok perlakuan 3 mengalami penurunan yang lebih besar dibandingkan perlakuan 2. Sehingga dapat disimpulkan kelompok perlakuan yang paling baik dalam menurunkan morfologi spermatozoa normal serta meningkatkan abnormalitas pada morfologi spermatozoa adalah kelompok perlakuan 3 dengan dosis 800 mg. Hal ini berarti semakin besar dosis ekstrak daun Dadap Ayam yang digunakan maka persentase morfologi spermatozoa yang abnormal akan semakin meningkat.

Menurut Ermayanti et al (2010), meningkatnya bentuk spermatozoa yang abnormal kemungkinan disebabkan oleh abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Berdasarkan hasil pengamatan, bentuk abnormalitas yang paling banyak dijumpai adalah abnormalitas primer, yaitu kelainan pada kepala seperti kepala rusak dan tanpa kepala. Sedangkan abnormalitas

sekunder yang paling banyak dijumpai, yaitu kelainan pada ekor seperti ekor pendek dan tanpa ekor. Abnormalitas primer terjadi diduga karena adanya gangguan spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus pada fase spermiogenesis yaitu pada saat pembentukan spermatozoa dari spermatid, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi diduga karena adanya gangguan maturasi spermatozoa dalam epididimis.

Peningkatan abnormalitas morfologi spermatozoa akibat pemberian ekstrak daun Dadap Ayam juga disebabkan karena adanya kandungan alkaloid. Menurut Sundari dan Winarno (1997), alkaloid dapat menekan sekresi hormon testosteron. Apabila kadar testosteron rendah maka kemungkinan terjadi gangguan pada perkembangan spermatid menjadi spermatozoa dan proses pematangan spermatozoa di epididimis yang menyebabkan terjadinya abnormalitas spermatozoa (Partodiharjo, 1980).

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya tentang potensi tumbuhan *Erythrina* sebagai antifertilitas oleh Herlina et al (2008) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun Dadap Ayam dapat menurunkan motilitas serta dapat meningkatkan abnormalitas morfologi spermatozoa.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun Dadap Ayam secara statistik dapat mempengaruhi bentuk morfologi spermatozoa secara signifikan ($p \leq 0,05$), namun tidak signifikan dalam menurunkan jumlah dan motilitas spermatozoa. Sedangkan berdasarkan pengamatan, ekstrak daun

Dadap Ayam dapat menurunkan jumlah dan motilitas.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan dosis yang lebih besar untuk membuktikan efek antifertilitas dari daun Dadap Ayam.

DAFTAR PUSTAKA

Cambie, R.C., and Brewis A.A. 1995. *Antifertility Plants of The Pacific*. CSIRO, Australia.

Ermayanti, N.G.A.M., dan N.M.R. Suarni. 2010. Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus L.*) Setelah Perlakuan Infus Kayu Amargo (*Quassia amara* Linn.) dan Pemulihannya. *Jurnal biologi*. **14(2)**: 45-49

Ganong, W.F. 2001. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.

Grady, A.V., and Nelson, L 1972. *Cationic influences on sperm biopotensial*. *Experimental Cell Research*

Hanum, F., and L.J.G. Maesen. 1997. *Plant Resources of South-East Asia*. Prosea, Bogor.

Herlina, T., E. Julaeha., U. Supratman., A. Subarnas., S. Sutardjo. 2008. Potensi Tumbuhan *Erythrina* (Leguminosae) sebagai Antifertilitas. *Jurnal Kedokteran Maranatha*. **7(2)**: 1-8.

Merck Index. 1985. *An Encyciopedia of Chemical and Drugs*. Merck and Company, New Yersey.

Partodihardjo, S. 1980. *Imu Reproduksi Hewan*. Mutiara, Jakarta

Robertis E.D., and Robertis, E.M. 1979. *Cell and moleculer Biology*. Sauders Colleg, Philadelphia.

Soehadi, K., dan K.M. Arsyad. 1983. *Analisis Sperma*. Universitas Airlangga, Surabaya.

Soehadi, K., dan H. Winars. 1987. *Arah Pemeriksaan Laboratorium Andrologi*. Universitas Airlangga, Surabaya.

Sundari, D., dan Winarno, W. 1997. *Informasi Tanaman Obat Untuk Kontrasepsi Tradisional*. Penerbit Cermin Dunia Kedokteran, Jakarta.

Susetyarini, E. 2009. Efek Senyawa Aktif Daun Beluntas terhadap Kadar Testosteron Tikus (*Rattus novergicus*) Jantan. *Journal Gamma*. **5(1)**: 21-27.

Warara, S.G., E.D. Queljoe., H.Simbala. 2016. Identifikasi Senyawa Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Dadap Ayam (*Erythrina variegata L.*) dari Tidore Kepulauan Menggunakan Metode Bslt . *Journal Pharmacon*. **5(3)**: 102-109.

World Health Organization. 2010. *WHO Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen*. 5th Edition. WHO Press, Switzerland.