

Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Pepaya Tua dan Ekstrak Metanol Biji Pepaya Muda (*Carica papaya* L.) terhadap Kualitas dan Kuantitas Spermatozoa Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)
(Effect of Methanolic Extract of Ripe and Raw Papaya Seeds (*Carica papaya* L.) on Quality and Quantity of Male Rat's Spermatozoa (*Rattus norvegicus*))

Dwi Novita Wijayanti, Siti Muslichah, Endah Puspitasari
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37 Jember 68121
email korespondensi: dwi.novita.wijayanti@gmail.com

Abstract

This research was aimed to determine the effect of antifertility among the methanol extract of ripe and raw papaya seeds in decreasing the quality and quantity of spermatozoa. Animal test rats were divided into 3 groups: negative control (CMC-Na 1%) and the treatment groups given methanol extract of ripe and raw papaya seeds extract. The extracts were given orally for 20 days. On the 21st day, mice were dissected to obtain sperm from the cauda epididymis, then were observed for the quality (motility, viability, morphology) and the quantity of spermatozoa. One-Way ANOVA followed by Post Hoc Test LSD analysis showed that was better for its activity then that of the ripe papaya seed extract.

Keywords: ripe papaya seed, raw papaya seed, quality, quantity, spermatozoa.

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek antifertilitas yang lebih baik antara ekstrak metanol biji pepaya tua dan muda dalam menurunkan kualitas dan kuantitas spermatozoa. Hewan uji tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (CMC-Na 1%), kelompok perlakuan ekstrak metanol biji pepaya tua, dan ekstrak biji pepaya muda. Pemberian suspensi ekstrak dilakukan per oral selama 20 hari. Pada hari ke-21 tikus dibedah untuk memperoleh sperma dari kauda epididimis, kemudian dilakukan pengamatan terhadap kualitas (motilitas, viabilitas, morfologi) dan kuantitas spermatozoa. Setelah itu dilakukan analisis menggunakan uji *One-Way Anova* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD* untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan signifikan. Ekstrak metanol biji pepaya muda memiliki efek antifertilitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak biji pepaya tua.

Kata kunci: biji pepaya tua, biji pepaya muda, kualitas, kuantitas, spermatozoa.

Pendahuluan

Pertambahan jumlah penduduk merupakan masalah yang cukup penting bagi setiap negara terutama bagi negara berkembang seperti Indonesia. Berdasarkan sensus penduduk tahun 2010, jumlah penduduk di Indonesia mencapai 237.641.326 jiwa, jumlah tersebut lebih banyak jika dibandingkan tahun

2000 dengan jumlah penduduk sebanyak 206.264.595 jiwa [1]. Kondisi kependudukan seperti ini merupakan masalah yang dapat mempengaruhi kehidupan sosial karena jumlah penduduk yang besar memerlukan perhatian dalam penyediaan bahan pangan, pendidikan, kesehatan, dan lapangan pekerjaan [2].

Salah satu upaya pemerintah untuk menekan jumlah penduduk Indonesia adalah

mengadakan program Keluarga Berencana (KB) yang dicanangkan oleh Badan Koordinasi Keluarga Berencana (BKKBN) bagi pasangan suami istri dalam usia subur [2]. Program KB ini bertujuan untuk meningkatkan kepedulian dan peran serta masyarakat melalui pendewasaan usia perkawinan, pengaturan kelahiran, pembinaan ketahanan keluarga, peningkatan kesejahteraan keluarga kecil, dan bahagia [3]. Agar program KB tersebut berhasil, maka program ini harus dilakukan oleh semua pihak baik wanita maupun pria [4].

Program KB saat ini masih didominasi oleh wanita sedangkan pria belum banyak berpartisipasi [4]. Keberhasilan program KB ini sangat terkait dengan penggunaan alat kontrasepsi. Namun, kurangnya keterlibatan pria dalam penggunaan kontrasepsi dapat menyebabkan KB kurang efektif sehingga perlu perkembangan teknologi kontrasepsi yang lebih mengarah pada pria [5].

Penelitian mengenai bahan alam sebagai agen antifertilitas mulai dikembangkan, sehingga diharapkan aman bagi kesehatan, efektif dalam menurunkan kualitas dan kuantitas (jumlah) spermatozoa, *reversible*, serta dapat diterima oleh masyarakat [6]. Salah satu bahan alam yang diduga mempunyai aktivitas antifertilitas adalah biji pepaya [7]. Ekstrak metanol biji pepaya diduga mengandung alkaloid, triterpenoid, dan steroid sebagai agen antifertilitas [8]. Senyawa tersebut dapat memberikan efek sitotoksik yang dapat mengganggu metabolisme sel germinal dan sel spermatogenik [9]. Biji pepaya juga mengandung protein yang bersifat proteolitik sehingga mampu menurunkan viskositas semen [10].

Pada penelitian ini, akan dilakukan uji aktivitas antifertilitas biji pepaya dengan membandingkan antara ekstrak biji pepaya tua dan ekstrak biji pepaya muda dengan dosis 100 mg/kg BB, menggunakan pelarut metanol yang akan diujikan pada tikus putih jantan dengan melihat parameter kualitas dan kuantitas spermatozoa.

Metode Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: maserator, seperangkat alat gelas (Pyrex), *rotary evaporator*, timbangan digital, sonde, alat bedah, kamar hitung Neubauer, mikroskop cahaya (Olympus BX53F). Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain biji pepaya tua berwarna hitam

dari buah pepaya yang sudah matang, biji pepaya muda berwarna putih dari buah pepaya mentah, pepaya yang digunakan varietas Bangkok, diperoleh dari Desa Sukorejo, Kecamatan Bangsalsari, Kabupaten Jember, metanol 70%, CMC-Na 1%, akuades, kloroform, garam fisiologis (NaCl 0,9%), dan eosin 1%.

Biji pepaya dikeringkan di bawah sinar matahari, dihancurkan untuk memisahkan kulitnya, dihaluskan dengan cara diblender, diayak, dan ditimbang untuk perlakuan proses selanjutnya.

Serbuk simplisia sebanyak 750 gram direndam dalam metanol (1 : 6) sebanyak 6 kali dari berat serbuk simplisia (4,5 liter). Dilakukan remaserasi selama 3 kali. Maserat disaring dengan bantuan corong buchner. Filtrat yang diperoleh kemudian ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C sampai didapatkan hasil akhir berupa ekstrak kental metanol biji pepaya. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang.

Subjek uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba berupa tikus putih jantan galur wistar dengan berat 100-200 gram berumur 2-3 bulan. Hewan uji dikelompokkan menjadi 3 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus: 1) kelompok kontrol negatif (CMC-Na 1%), 2) kelompok perlakuan dengan pemberian suspensi ekstrak metanol biji pepaya tua dosis 100 mg/kg BB, 3) kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak metanol biji pepaya muda dosis 100 mg/kg BB. Hewan coba diberi perlakuan selama 20 hari.

Pada hari ke-21, tikus dianestesi dengan cara inhalasi menggunakan kloroform, kemudian dibedah untuk memperoleh sperma dari kauda epididimis. Kemudian, dilakukan pengamatan terhadap kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas, morfologi) dan kuantitas (jumlah) spermatozoa.

Motilitas spermatozoa merupakan kemampuan spermatozoa untuk mendorong diri maju ke depan, akibat adanya substansi kontraktile pada bagian tubuh spermatozoa diteruskan ke seluruh bagian ekor spermatozoa. Motilitas spermatozoa diperoleh dengan cara menghitung persentase spermatozoa kategori progresif yaitu sperma dengan gerakan yang cepat dan lurus ke depan dalam 100 spermatozoa. Motilitas sperma dikatakan abnormal jika hasil perhitungan $\leq 32\%$ spermatozoa yang bergerak progresif [11].

Viabilitas menunjukkan kemampuan spermatozoa bertahan hidup setelah dikeluarkan dari organ reproduksi jantan [12]. Viabilitas dikatakan normal jika 58% atau lebih spermatozoa hidup, yaitu tidak terwarnai oleh pengecatan, bila nilainya kurang dari normal maka kemampuan spermatozoa bertahan hidup sangat kecil sehingga kemampuan spermatozoa dalam membuahi ovum juga sangat kecil [11].

Morfologi spermatozoa merupakan salah satu parameter yang juga penting dalam menentukan kualitas spermatozoa karena dapat menentukan kemampuan spermatozoa dalam bergerak dan membuahi sel telur. Jika jumlah abnormalitas atau kelainan morfologi spermatozoa kurang dari normal karena banyaknya organ sel yang rusak maka kemampuan bergerak spermatozoa dalam membuahi sel telur semakin kecil [13]. Morfologi spermatozoa dikatakan abnormal jika jumlah persentase kurang dari 40% [14].

Kuantitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung jumlah sperma menggunakan kamar hitung Neubauer pada 5 lapang pandang [11]. Jumlah spermatozoa normal pada tikus jantan ≥ 20 juta/ml. Jika jumlahnya kurang dari normal maka kemungkinan terjadinya fertilisasi semakin kecil [18].

Data penelitian yang diperoleh dianalisis menggunakan program statistik dengan taraf kepercayaan 95% dan signifikan pada level 0,05. Analisis data statistik dilakukan menggunakan uji parametrik *One-Way Anova* dengan syarat sebaran data harus normal dan homogen. Jika syarat uji terpenuhi dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* menggunakan nilai *LSD* untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan signifikan.

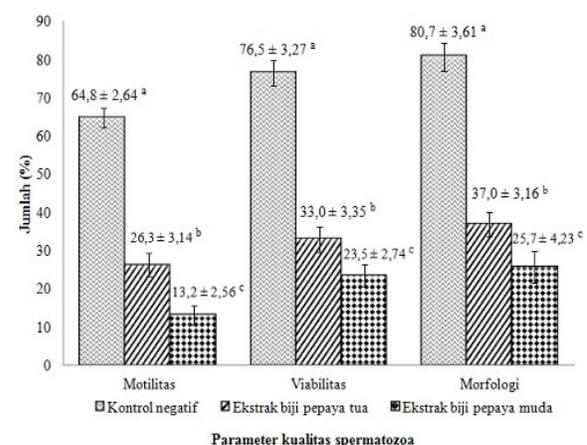
Hasil Penelitian

Hasil pengamatan kualitas spermatozoa diperoleh dengan cara menghitung jumlah (%) motilitas, viabilitas, dan morfologi spermatozoa dari kauda epididimis tikus jantan. Perhitungan kualitas spermatozoa ditunjukkan pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, jumlah (%) motilitas spermatozoa tikus putih jantan pada masing-masing kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok ekstrak metanol biji pepaya tua, dan pemberian ekstrak metanol biji pepaya muda dengan dosis 100 mg/kg BB diketahui bahwa kelompok ekstrak metanol biji pepaya muda mempunyai motilitas spermatozoa yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak

metanol biji pepaya tua yaitu $13,2 \pm 2,56\%$. Ekstrak biji pepaya muda juga memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif dan ekstrak biji pepaya tua dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Pada penelitian ini, kelompok perlakuan ekstrak metanol biji pepaya muda juga memiliki nilai (%) viabilitas spermatozoa lebih rendah dibandingkan kelompok ekstrak biji pepaya tua yaitu $23,5 \pm 2,74\%$. Ekstrak biji pepaya muda juga memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif dan ekstrak biji pepaya tua dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Viabilitas spermatozoa ditunjukkan pada Gambar 2.

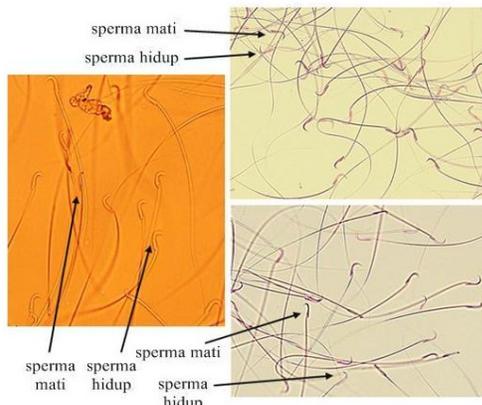


Gambar 1. Jumlah (%) masing-masing parameter kualitas spermatozoa tikus putih jantan setelah perlakuan selama 20 hari, data ditunjukkan dalam rata-rata \pm SD dengan $n = 6$, notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) analisis dilakukan pada parameter yang sama berdasarkan uji *LSD*.

Berdasarkan hasil pada penelitian ini, terjadi penurunan viabilitas spermatozoa tikus putih jantan pada pemberian ekstrak metanol biji pepaya tua dan ekstrak metanol biji pepaya muda jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan ekstrak metanol biji pepaya muda memiliki nilai viabilitas spermatozoa lebih rendah dibandingkan kelompok ekstrak biji pepaya tua yaitu $23,5 \pm 2,74\%$. Ekstrak biji pepaya muda juga memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif dan ekstrak biji pepaya tua dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

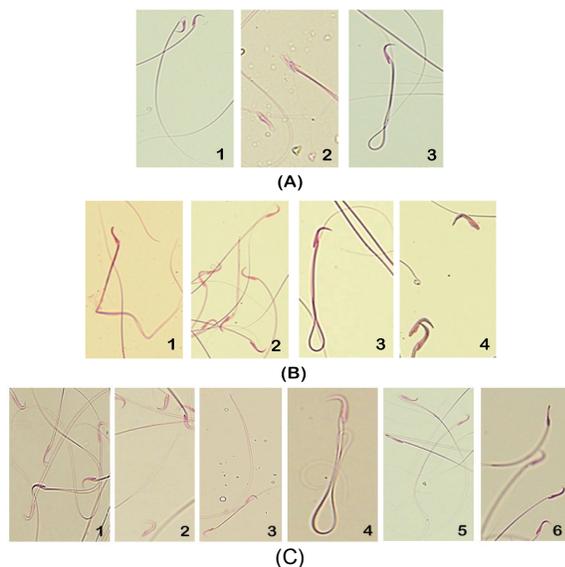
Pada penelitian ini juga terjadi penurunan jumlah (%) spermatozoa normal setelah pemberian ekstrak metanol biji pepaya tua dan muda. Kelompok perlakuan ekstrak metanol biji pepaya muda memiliki jumlah (%) spermatozoa normal lebih rendah dibandingkan kelompok

ekstrak biji pepaya tua yaitu $25,7 \pm 4,23\%$. Ekstrak biji pepaya muda memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif dan ekstrak biji pepaya tua dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$).



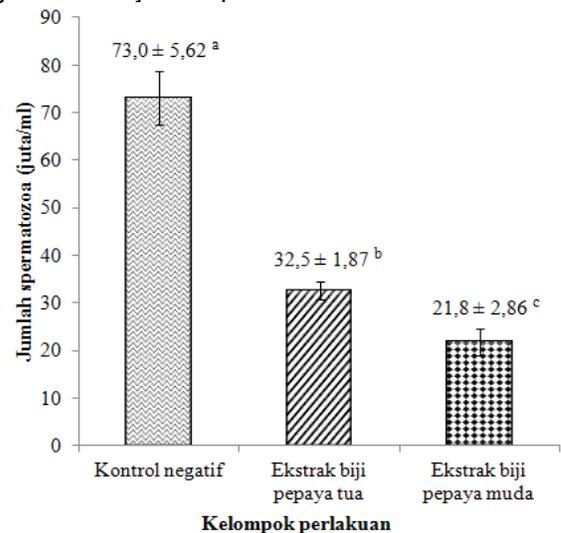
Gambar 2. Perbandingan jumlah spermatozoa hidup (transparan) dan spermatozoa mati (merah) pada kelompok kontrol (A), kelompok pemberian ekstrak biji pepaya tua (B), dan kelompok pemberian ekstrak biji pepaya muda (C) dengan perbesaran 400 kali.

Hasil perhitungan jumlah morfologi (%) spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Perbandingan morfologi spermatozoa pada kelompok kontrol (A) dengan abnormalitas 1) leher patah, 2) kepala ganda, dan 3) ekor menggulung (*coil*); pada kelompok ekstrak biji pepaya tua (B) dengan abnormalitas 1) ekor bengkok, 2) ekor pendek, 3) ekor menggulung (*coil*), dan kepala putus; pada kelompok ekstrak biji pepaya muda (C) dengan abnormalitas 1) ekor melengkung, 2) kepala putus, 3) tanpa kepala, 4) ekor menggulung (*coil*), 5) leher patah, dan 6) kepala runcing (*tapered*) yang diamati dengan perbesaran 400 kali.

Kelompok perlakuan ekstrak biji pepaya muda memiliki jumlah spermatozoa lebih rendah dibandingkan kelompok ekstrak biji pepaya tua yaitu $21,8 \pm 2,86$ juta/ml. Ekstrak biji pepaya muda juga memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif dan ekstrak biji pepaya tua dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Hasil perhitungan jumlah spermatozoa (juta/ml) yang diambil dari kauda epididimis tikus putih jantan ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Jumlah spermatozoa (juta/ml) tikus putih jantan setelah pemberian perlakuan selama 20 hari, data ditunjukkan dalam rata-rata \pm SD dengan $n = 6$, nilai yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) berdasarkan uji LSD.

Pembahasan

Pada penelitian ini, terjadinya penurunan jumlah (%) motilitas karena adanya kandungan senyawa dalam biji pepaya yaitu alkaloid, steroid, triterpenoid yang memberikan efek sitotoksik sehingga dapat mengganggu metabolisme sel germinal dan sel spermatogenik [9]. Senyawa alkaloid diduga dapat mengganggu aktivitas enzim ATP-ase pada membran sel spermatozoa di bagian tengah ekor [6]. Enzim ATP-ase ini berfungsi mempertahankan homeostasis internal untuk ion natrium dan kalium. Jika aktivitas enzim ATP-ase terganggu, maka homeostasis ion natrium dan kalium akan terganggu sehingga konsentrasi Na^+ intrasel meningkat, gradien Na^+ melintasi membran sel akan menurun sehingga pengeluaran Ca^{2+} juga akan mengalami penurunan [13]. Apabila ion Ca^{2+} berkurang maka membran akan kehilangan kemampuannya untuk mengangkut bahan-bahan terlarut ke dalam. Dengan terganggunya

permeabilitas membran sperma akan menyebabkan terganggunya transpor nutrisi yang diperlukan oleh spermatozoa untuk pergerakannya [6].

Penelitian ini juga menunjukkan terjadinya penurunan jumlah spermatozoa viabilitas pada ekstrak metanol biji pepaya muda yang lebih besar dibandingkan ekstrak biji pepaya tua. Hal ini karena adanya enzim papain yang terkandung dalam biji pepaya yang mempunyai kemampuan menguraikan ikatan-ikatan dalam molekul protein sebagai bahan baku sintesis hormon reproduksi, sehingga protein terurai menjadi polipeptida dan dipeptida akibatnya sintesis hormon reproduksi akan menurun. Papain dapat merusak organel sel sertoli dan sel spermatogenik yang penting dalam proses spermatogenesis (spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa).

Penurunan jumlah viabilitas ini juga dapat disebabkan karena adanya sekresi hormon testosteron oleh sel leydig [6]. Hormon testosteron berperan dalam menjaga kelangsungan hidup spermatozoa di dalam epididimis [15]. Penurunan sekresi hormon testosteron pada tikus putih akan mengakibatkan kelangsungan hidup spermatozoa di dalam epididimis mengalami penurunan [16].

Sama halnya dengan parameter yang lain (motilitas dan viabilitas), ekstrak biji pepaya muda mampu menurunkan jumlah morfologi spermatozoa lebih banyak dibandingkan ekstrak biji pepaya tua. Hal ini dikarenakan kandungan senyawa aktif dalam biji pepaya muda lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol biji pepaya tua [17]. Kandungan senyawa kimia dalam ekstrak metanol biji pepaya muda yang lebih besar ini dapat memberikan efek antifertilitas yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak biji pepaya tua.

Abnormalitas spermatozoa yang meningkat juga dapat terjadi karena berbagai gangguan terutama dalam proses spermatogenesis, terutama pada tahap spermiogenesis. Perubahan bentuk spermatozoa tersebut disebabkan karena penurunan testosteron. Secara fungsional epididimis tergantung pada testosteron dalam proses perubahan tersebut, sehingga jika kadar testosteron menurun akan menyebabkan terjadinya morfologi spermatozoa yang abnormal. Dalam epididimis spermatozoa mengalami serangkaian perubahan morfologi dan fungsional seperti ukuran, bentuk, ultrastruktur [18].

Penurunan jumlah spermatozoa (juta/ml) pada penelitian ini, terjadi akibat adanya senyawa kimia yang terkandung baik dalam biji pepaya tua ataupun muda yang diduga bertanggung jawab sebagai agen antifertilitas yaitu senyawa alkaloid. Alkaloid dalam biji pepaya dapat menyebabkan degenerasi sel sperma serta menurunkan jumlah sel sperma [19]. Alkaloid yang terdapat pada biji pepaya juga memberikan efek sitotoksik yang dapat mengganggu sel germinal dan sel spermatogenik [9]. Menurunnya jumlah sel spermatogenik juga disebabkan oleh menurunnya kadar testosteron karena adanya kandungan senyawa kimia dalam biji pepaya yang bersifat sitotoksik dan menyebabkan metabolisme sel spermatogenik terganggu seperti alkaloid, triterpenoid dan steroid [9]. Alkaloid yang terkandung di dalam biji pepaya berperan dalam penurunan kadar testosteron sehingga dapat memberikan aktivitas antifertilitas [7].

Proses normal spermatogenesis diatur oleh sistem hormon (FSH, LH, dan testosteron), yang pengendaliannya melalui poros hipotalamus-hipofisis-testis. FSH mempengaruhi sel sertoli dan sel spermatogenik untuk metabolisme normal, sel sertoli di bawah pengaruh FSH mensintesis protein pengikat androgen (ABP) yang berfungsi untuk mengikat testosteron, untuk selanjutnya digunakan dalam proses pembelahan dan pematangan spermatogonia menjadi spermatozoa. Adapun LH penting dalam mempengaruhi sel leydig memproduksi testosteron. Kontrol hormonal pada sistem reproduksi jantan yang terganggu akan berakibat pada proses spermatogenesis. Gangguan pada pematangan spermatozoa menyebabkan spermatozoa yang dihasilkan tidak normal sehingga proses fertilisasi akan terganggu [20].

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada DP2M Dikti yang telah memberikan bantuan dana penelitian melalui lembaga penelitian Universitas Jember.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol biji pepaya tua dan ekstrak metanol biji pepaya muda dengan dosis 100 mg/kg BB berpengaruh menurunkan kualitas (motilitas, viabilitas, dan morfologi) serta kuantitas (jumlah) spermatozoa. Kelompok perlakuan ekstrak metanol biji pepaya

muda memiliki efek antifertilitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak metanol biji pepaya tua karena memiliki kemampuan lebih tinggi dalam menurunkan kualitas dan kuantitas spermatozoa tikus putih jantan.

Saran dari penelitian ini yaitu perlu dilakukan pengembangan penelitian menggunakan ekstrak biji pepaya muda dalam kaitannya dengan efek antifertilitas dalam menurunkan kualitas dan kuantitas spermatozoa.

Daftar Pustaka

- [1] BPS (Badan Pusat Statistik). Perkembangan beberapa indikator utama sosial-ekonomi Indonesia. Jakarta: Badan Pusat Statistik; 2012.
- [2] BKKBN. Profil kependudukan dan pembangunan di Indonesia tahun 2013. Jakarta: BKKBN; 2013.
- [3] Sekretaris Negara Republik Indonesia. Undang-undang republik Indonesia nomor 10 tahun 1992 tentang perkembangan kependudukan dan pembangunan keluarga sejahtera. [internet]. Jakarta. 1992; <http://jdih.ristek.go.id/?q=system/files/perundangan/1832106386>.
- [4] Wilopo SA. Perkembangan teknologi kontrasepsi pria terkini, gema pria. 2006; (<http://pikas.bkkbn.go.id/gemapria/articledet ail.php>).
- [5] Sumaryati A. Tahun ini KB laki-laki mulai digalakkan. Badan Koordinator Keluarga Nasional. 2004; http://www.bkkbn.go.id/article_detail.php.
- [6] Ashfahani ED, Wiratmini NI, Sukmaningsih AASA. Motilitas dan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah pemberian ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe.). Jurnal Biologi. 2010; XIV, (1): 20-23.
- [7] Satriyasa BK, Pangkahila WI. Fraksi heksan dan fraksi metanol ekstrak biji pepaya muda menghambat spermatogonia mencit (*Mus musculus*) jantan. J Vet. 2010; 11 (1): 36-40.
- [8] Sukadana IM, Santi SR, Juliarti NK. Aktivitas antibakteri senyawa golongan triterpenoid dari biji pepaya (*Carica papaya* L.). Jurnal Kimia. 2008; 2 (1): 15-18.
- [9] Lohiya NK, Manivannan B, Mishra PK, Pathak N, Sriram S, Bhande SS, et al. Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey. Asian J Androl. 2002; 4 (1): 17-26.
- [10] Sarifudin, Salmiati, Zulkamain. Pengaruh biji pepaya (*Carica papaya* Linn) terhadap spermatogenesis mencit. Dalam Soejono, S. (Ed.). Prosiding pertemuan ilmiah tahunan pandi. Yogyakarta: Perkumpulan Andrologi Indonesia; 1986.
- [11] World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition. Geneva: WHO Press; 2010.
- [12] Arsyad KM, Hayati L. Penuntun laboratorium WHO untuk pemeriksaan semen manusia dan interaksi sperma-getah servik. Palembang: Universitas Sriwijaya; 1994.
- [13] Ganong MD, William F. Fisiologi kedokteran. Terjemahan Adji Dharma. Jakarta: EGC Kedokteran; 1995.
- [14] Nuraini T, Kusmana D, Afifah, E. Penyuntikan ekstrak biji *Carica papaya* L. varietas cibinong pada *Macaca fascicularis* L. dan kualitas spermatozoa serta kadar hormon testosteron. Makara Kes. 2012;16 (1): 9-16.
- [15] Stanier MW, Forsling, M. Physiological processes: an introduction to mammalian physiology. England: Mc Graw-Hill Book Company; 1990.
- [16] Ashok P, Meenakshi B. Contraceptive effect of *Curcuma longa* (L.) in male albino rat. [internet]. Asian J Androl. 2004; 6: 71-74. <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682x/6/71.htm>.
- [17] Mulyono LM. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji buah pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya. 2013; 2 (2): 1-9.
- [18] Erris, Harahap I. Pengaruh kebisingan terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa. Media Litbangkes. 2014; 24 (3): 123-128.
- [19] Udoh P, Essien I, Udoh F. Effects of *Carica papaya* (pawpaw) seed extract on the morphology of pituitary-gonadal axis of male wistar rats. Phytoterapy Research. 2005; 19: 1065-1068.
- [20] Adimunca C. Kemungkinan pemanfaatan ekstrak buah pare sebagai bahan kontrasepsi pria. Jakarta: Puslitbang PT Kalbe Farma; 1996.