

PENGARUH BAHAN STEROL DALAM BIJI
LAMTORO GUNG TERHADAP GAMBARAN
HISTOLOGIS SEL-SEL SPERMATOGENIK TESTIS
TIKUS PUTIH*

Rina Priastini S**

Abstract

It has been know that lamtoro gung seed (Leucaena leucocephala) contains some chemical compounds such as sitosterol, stigmasterol and kampesterol that indicate an antifertility effect compound.

The objective of this research is to study or to clarify the effect of sterol from lamtoro gung seed on : (1) morphology of seminiferous tubules (epithelial thickness and epithelial diameter), (2) spermatogenesis (number of primer spermatocytes and number of round spermatid), and (3) weight of rats testis.

This research was carried out experimentally with statistical design Completely Randomized Design, using 30 fertile male rat. The male rat are split into 5 groups depend on the dosage of that sterol are given : I (control, without sterol), II (sterol 0.25 mg/kg BW/d), III (sterol 0.50 mg/kg BW/d), IV (sterol 1.00 mg/kg BW/d) and V (sterol 2.00 mg/kg BW/d). After 45 day of the giving sterol, the sample (rat) are sacrificed for histological evaluation of the testis.

As conclusion, the increase in dosage of sterol, especially dosage 1.00 mg/kg BW/d and 2.00 mg/kg BW/d causes a significant difference of the decrease in number of primer spermatocytes, number of round spermatid and epithelial diameter. Beside it, in dosage of sterol until 2.00 mg/kg BW/d causes not significant difference of the decrease in number of epithelial thickness.

* Dipresentasikan pada Acara Ilmiah FK. Ukrida

** Staf Pengajar Departemen Biologi Kedokteran Ukrida

Pendahuluan

Sampai saat ini dapat dikatakan bahwa program Keluarga Berencana (KB) Nasional cukup berhasil, yaitu berdasarkan hasil survei penduduk Indonesia pada tahun 1980 and 1990, angka pertumbuhan penduduk telah menurun dari 2.32% menjadi 1.97%. Dengan menurunnya pertumbuhan penduduk yang telah dicapai bukan berarti masalah kependudukan telah selesai. Hal ini disebabkan masalah kependudukan tetap akan menjadi bahan pemikiran nasional, karena pertumbuhan penduduk yang relatif masih tinggi.

Hardjowijoto (1992) menyatakan satu-satunya cara untuk menekan jumlah penduduk adalah dengan menurunkan lagi laju pertumbuhan penduduk. Cara yang dilakukan adalah meningkatkan pelayanan KB. Pelaksanaan program ini dilakukan secara terpadu dengan semua pihak, tidak terkecuali peran serta kaum laki-laki sangat diharapkan.⁷

Sampai saat ini, sebagian besar program KB dikenakan terhadap kaum perempuan, sementara keterlibatan laki-laki masih sangat kurang yaitu sekitar 6%.¹ Kurangnya partisipasi laki-laki mungkin disebabkan masih terbatasnya sarana metode kontrasepsi yang dapat digunakan. Ada 3 metode yang dianggap dapat digunakan untuk laki-laki yaitu : kondom, vasektomi dan sanggama terputus.⁸

Untuk mengatasi hal tersebut perlu dilakukan penelitian-penelitian agar didapatkan kontrasepsi laki-laki yang baik, sehingga metodenya lebih bervariasi yang akhirnya akan meningkatkan partisipasi laki-laki.

Astika (1991) menyatakan bahwa salah satu usaha yang sedang diupayakan adalah mencari obat antifertilitas laki-laki yang dapat diberikan per oral.² Karena kontrasepsi dalam bentuk oral dilaporkan menduduki tempat teratas dalam jumlah penggunaannya, dan akan terus meningkat pada masa yang akan datang sesuai dengan meningkatnya akseptor.¹³

Indonesia yang kaya akan tanaman obat tradisional sepatutnya dapat dimanfaatkan untuk mencari bahan baku pembuatan kontrasepsi laki-laki secara oral. Menurut Telek dkk (1971) bahan baku kontrasepsi oral yang digunakan mempunyai struktur dasar steroid, di mana sebagian besar senyawa ini terdapat pada tanaman. Beberapa jenis tanaman yang mengandung steroid antara lain : *Dioscorea* spp, *Costus* spp, dan *Solanum* spp.¹⁶ Beberapa tanaman tersebut telah diteliti dan ternyata mempengaruhi spermatogenesis atau bersifat spermisida. Salah satu tanaman yang sedang giat diteliti adalah biji lamtoro gung (*Leucaena leucocephala* Lam. de Wit).

PENGARUH BAHAN

Priastini dkk (1995) menyatakan bahwa pemberian daun lamtoro gung segar lebih dari 20% dapat menyebabkan kerusakan testis dan menghambat spermatogenesis pada mencit jantan.⁹ Sarmanu (1988) menyatakan bahwa secara ultrastruktur tikus putih yang diberi makanan mengandung biji lamtoro gung sebanyak 10% menampakkan inti sel Leydig dan mitokondria yang mengecil.¹¹ Rahayu (1994) mengemukakan bahwa pemberian ekstrak biji lamtoro gung sebesar 0.96 g/kg BB dan 1.92 g/kg BB mencit jantan mempengaruhi jumlah spermatosit dan spermatid.¹⁰ Terakhir, penelitian Susanti (1986) yang tak kalah pentingnya yaitu adanya kandungan sterol dalam biji lamtoro gung yang merupakan bahan dasar untuk kontrasepsi.¹⁵ Namun penelitian lebih lanjut tentang sterol ini belum dilakukan.

Menurut de Kretser (1979), obat-obat antifertilitas laki-laki dapat dikelompokkan menjadi tiga berdasarkan aktifitasnya, yaitu : mempengaruhi sistem hormonal yang mengatur fungsi testis, menghambat spermatogenesis dengan cara mempengaruhi langsung fungsi testis dan mempengaruhi daya fertilisasi spermatozoa.⁴

Berdasarkan alasan tersebut, maka dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh bahan sterol dalam biji lamtoro gung terhadap spermatogenesis testis tikus putih.

Penelitian ini dirancang untuk menjawab pokok permasalahan apakah pemberian bahan sterol dalam biji lamtoro gung dapat mempengaruhi berat testis, jumlah sel-sel spermatogenik, diameter tubulus dan tebal epitel tubulus seminiferus.

Tinjauan Pustaka

Sterol dalam Biji Lamtoro Gung

Susanti (1986) mengemukakan bahwa kandungan lamtoro gung yang utama tidak hanya mimosin, tetapi juga mengandung senyawa sterol. Sedangkan Sethi dan Kulharni (1995) menjelaskan bahwa biji lamtoro gung mengandung sterol sekitar 35%.¹²

Sterol adalah asal kata steroid atau hormon steroid. Pada umumnya hormon-hormon steroid disekresikan oleh korteks adrenal, testis, ovarium dan plasenta. Namun sejak tahun 1937 hormon steroid dapat diisolasi dari tumbuhan, yaitu stigmasterol yang merupakan steroid nabati pertama yang tersedia secara komersial.

Jadi, apabila sterol ini ingin digunakan sebagai salah satu bahan baku kontrasepsi oral bagi laki-laki, seperti halnya diosgenin, maka efek samping yang dihasilkan dari pemakaian sterol seharusnya tidak membahayakan. Di samping masa atau waktu pemakaiannya tidak terlalu lama.

Histologi Testis

Clermont dan Huckins (1961) menyatakan panjang rata-rata dari satu tubulus seminiferus tikus putih dewasa 32.2 cm dan diameternya 2.50 mikron. Tubulus seminiferus dibatasi oleh suatu epitel germinal kompleks yang merupakan modifikasi epitel berlapis kuboid. Epitel seminiferus terdiri atas dua kategori sel yang berbeda, yaitu sel penyokong dan nutrisi, serta sel spermatogenik. Sel-sel spermatogenik membentuk bagian terbesar dari lapisan epitel dan melalui proses proliferasi serta diferensiasi yang kompleks akan menghasilkan spermatozoa.

Sel spermatogenik membentuk lapisan epitel dengan ketebalan 4 sampai 8 sel pada dinding tubulus seminiferus. Sel-sel spermatogenik terdiri atas spermatogonia, spermatosit, spermatid dan spermatozoa. Spermatogonia terdapat di membran basal dan terdiri atas dua tipe yaitu spermatogonia tipe A dan B. Spermatogonia tipe A memiliki inti yang lebih bulat dan mengandung bahan-bahan kromatin, sedangkan spermatogonia B bentuknya lebih kecil dan membentuk spermatosit primer. Spermatosit primer mengalami meiosis yang kedua menjadi spermatosit sekunder, di mana volume spermatosit sekunder lebih kurang setengahnya spermatosit primer dan letaknya lebih ke arah lumen. Spermatosit sekunder kemudian membelah diri secara mitosis dan hasilnya adalah 4 sel spermatid. Spermatid yang baru terbentuk mempunyai sebuah inti bulat yang terletak di tengah sel. Kemudian paling dekat lumen tubulus seminiferus tampak spermatozoa.⁶

Spermatogenesis

Menurut Ferdinandus (1980) proses spermatogenesis adalah suatu proses perkembangan sel spermatogonia dari epitel seminiferus yang mengadakan proliferasi dan selanjutnya berubah menjadi spermatozoa yang bebas.⁶

Spermatogenesis dikendalikan oleh sistem saraf pusat dan dapat berjalan normal jika jalur antara hipotalamus-hipofisis-testis membentuk sistem neuroendokrin yang berjalan normal, melalui mekanisme *release* dan *feed back* antara ketiga organ tersebut. Hipotalamus merupakan tempat sintesa GnRH yang melalui sistem *release* akan merangsang hipofisis untuk mensekresikan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang akan merangsang testis untuk mensekresikan testosteron dan inhibin. Inhibin akan berperan sebagai modulator *signal feed back* ke hipotalamus untuk menghambat sintesa GnRH yang kemudian berakibat pada hipofisis. Di hipofisis akan dihambat sekresi FSH dan LH. Jadi berbagai manipulasi yang dilakukan pada tahap-tahap mekanisme pengontrolan dan

PENGARUH BAHAN

koordinasi fungsi testis akan dapat menimbulkan penurunan atau gangguan pada tingkat kesuburan laki-laki.

Pada prinsipnya salah satu langkah strategis yang dapat dilakukan untuk mengontrol fertilitas laki-laki adalah dengan menghambat laju produksi hormon yang mendukung terjadinya proses spermatogenesis. Langkah utama yang dapat dilakukan yaitu dengan menahan laju testosteron. Beberapa peneliti percaya bahwa cara sederhana untuk menghambat produksi hormon testosteron adalah dengan melakukan terapi androgen. Macam-macam terapi di antaranya dengan memberikan hormon steroid seperti sitosterol, progesteron, estrogen dan penekanan hormon gonadotropin seperti FSH.

Materi dan Metode Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah biji lamtoro gung yang diekstrak dalam bentuk sterol, bahan-bahan kimia untuk pembuatan preparat histologis, makanan berupa pelet. Digunakan hewan coba tikus putih jantan sebanyak 30 ekor dengan berat badan 200-220 gram. Sedangkan alat yang digunakan adalah alat untuk memperoleh sterol dari biji lamtoro gung, alat untuk memelihara tikus putih, alat untuk pembedahan dan pengambilan jaringan testis dan alat untuk pembuatan sediaan histologis testis.

Metode penelitian yang digunakan adalah *true experimental*, karena semua variabel yang berpengaruh selain perlakuan dapat dikendalikan.

Parameter yang akan diamati antara lain : perubahan berat testis, penghambatan spermatogenesis dengan melihat perubahan jumlah spermatosit primer, jumlah spermatid bulat, diameter tubulus seminiferus dan tebal epitel tubulus seminiferus.

Tikus putih jantan dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 6 ulangan, bahan sterol dalam biji lamtoro gung diberikan dengan variasi dosis dan perlakuan secara oral selama 6 minggu (45 hari).

Pembagian kelompok sebagai berikut :

- Kelompok 1 (P1) : kontrol (akuades)
- Kelompok 2 (P2) : 0.25 mg/kg BB/hari
- Kelompok 3 (P3) : 0.50 mg/kg BB/hari
- Kelompok 4 (P4) : 1.00 mg/kg BB/hari
- Kelompok 5 (P5) : 2.00 mg/kg BB/hari

Pemberian bahan sterol dilakukan setiap hari, sekitar pukul 08.00 pagi hari. Seperti yang dikatakan oleh Clermont dan Perey (1957) bahwa lamanya satu siklus spermatogenesis pada tikus putih berkisar antara 40-50 hari.³

Semua tikus (30 ekor) dibedah setelah 45 hari dan dibuat preparat histologis untuk testis, sebelumnya ditimbang berat testis. Pengukuran parameter dilakukan dengan cara mengamati perubahan pada 20 tubulus seminiferus yang terpotong melintang secara tegak lurus, dan yang berada pada tahap VII dan VIII dari siklus seminiferus pada setiap preparat testis dengan menggunakan mikroskop dan counter.

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap atau RAL.¹⁴

Hasil Penelitian

Berat Testis

Pemberian bahan sterol memperlihatkan adanya penurunan berat testis tikus putih dari setiap perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan hasil penimbangan testis kanan yang tertera pada Tabel I.

Tabel I. Rata-Rata Berat Testis Tikus Putih Perlakuan Bahan Sterol (gram)

Kelompok Penelitian	Berat Testis $X \pm SD$
P1 (kontrol)	1.476 \pm 0.0683
P2 (bahan sterol 0.25 mg/kg BB/h)	1.463 \pm 0.0489
P3 (bahan sterol 0.50 mg/kg BB/h)	1.443 \pm 0.0799
P4(bahan sterol 1.00 mg/kg BB/h)	1.449 \pm 0.0550
P5 (bahan sterol 2.00 mg/kg BL/h)	1.442 \pm 0.0344

Keterangan : $p > 0.05$ (tidak berbeda bermakna)

Jumlah Spermatisit Primer

Penghitungan dilakukan pada testis kanan dengan 20 tubulus seminiferus yang diamati dan ditentukan secara acak. Dipilih tubulus yang memiliki penampang bulat dengan ukuran yang kurang lebih sama. Tabel II menunjukkan jumlah spermatisit primer per tubulus seminiferus yang berbeda dalam kelompok-kelompok perlakuan.

PENGARUH BAHAN

Tabel II. Rata-Rata Jumlah Spermatisit Primer Per Tubulus Seminiferus Testis Tikus Putih Perlakuan Bahan Sterol

Kelompok Penelitian	Σ Spermatisit Primer $X \pm SD$
P1 (kontrol)	62.457 \pm 5.7018
P2 (bahan sterol 0.25 mg/kg BB/h)	59.873 \pm 6.3414
P3 (bahan sterol 0.50 mg/kg BB/h)	58.418 \pm 4.4570
P4 (bahan sterol 1.00 mg/kg BB/h)**	55.005 \pm 4.4570
P5 (bahan sterol 2.00 mg/kg BB/h)**	51.412 \pm 1.2821

Keterangan : $p < 0.01$ (berbeda sangat bermakna)**

Jumlah Spermatid Bulat

Seperti pada penghitungan jumlah spermatisit primer, untuk menghitung jumlah spermatid bulat per tubulus seminiferus masing-masing testis dilakukan pada 20 tubulus seminiferus yang dipilih secara acak, seperti pada Tabel III.

Tabel III. Rata-Rata Jumlah Spermatid Bulat Per Tubulus Seminiferus Testis Tikus Putih Perlakuan Bahan Sterol

Kelompok Penelitian	Σ Spermatisit Bulat $X \pm SD$
P1 (kontrol)	226.142 \pm 17.0214
P2 (bahan sterol 0.25 mg/kg BB/h)	214.333 \pm 22.9575
P3 (bahan sterol 0.50 mg/kg BB/h)	210.648 \pm 19.1726
P4 (bahan sterol 1.00 mg/kg BB/h)*	196.943 \pm 17.8677
P5 (bahan sterol 2.00 mg/kg BB/h)**	185.377 \pm 16.7394

Keterangan : $p < 0.05$ (berbeda bermakna)*
 $P < 0.01$ (berbeda sangat bermakna)**

Diameter Tubulus Seminiferus

Seperti pada penghitungan jumlah spermatisit primer dan jumlah spermatid bulat, untuk menghitung diameter tubulus seminiferus masing-masing testis juga dilakukan pada 20 tubulus yang dipilih secara acak seperti pada Tabel IV.

Tabel IV. Rata-Rata Diameter Tubulus Seminiferus Testis Tikus Putih Perlakuan Bahan Sterol (μ)

Kelompok Penelitian	Diameter $X \pm SD$
P1 (kontrol)	3.308 \pm 0.0462
P2 (bahan sterol 0.25 mg/kg BB/h)*	3.255 \pm 0.0274
P3 (bahan sterol 0.50 mg/kg BB/h)**	3.242 \pm 0.0331
P4 (bahan sterol 1.00 mg/kg BB/h)**	3.212 \pm 0.0440
P5 (bahan sterol 2.00 mg/kg BB/h)**	3.193 \pm 0.0350

Keterangan : $p < 0.05$ (berbeda bermakna)*
 $P < 0.01$ (berbeda sangat bermakna)**

Tebal Epitel Tubulus Seminiferus

Seperti pada penghitungan diameter tubulus, tebal epitel tubulus juga diukur secara acak pada 20 tubulus seminiferus seperti tertera pada Tabel V.

Tabel V. Rata-Rata Tebal Epitel Tubulus Seminiferus Testis Tikus Putih Perlakuan Bahan Sterol (μ)

Kelompok Penelitian	Tebal Epitel $X \pm SD$
P1 (kontrol)	0.670 \pm 0.0548
P2 (bahan sterol 0.25 mg/kg BB/h)	0.638 \pm 0.0392
P3 (bahan sterol 0.50 mg/kg BB/h)	0.623 \pm 0.0301
P4 (bahan sterol 1.00 mg/kg BB/h)	0.613 \pm 0.0437
P5 (bahan sterol 2.00 mg/kg BB/h)	0.612 \pm 0.0387

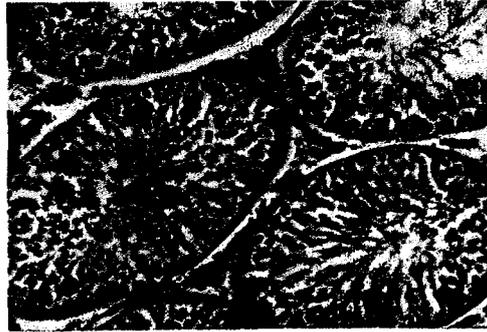
Keterangan : $p > 0.05$ (tidak berbeda bermakna)

Pembahasan

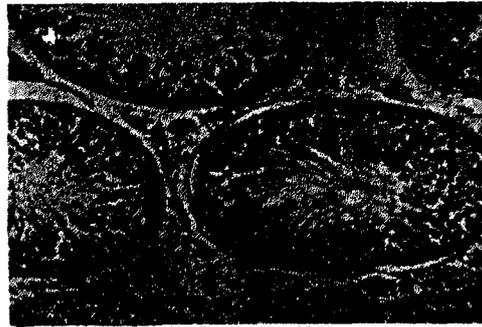
Penampang melintang testis tikus putih untuk kelompok kontrol, jaringan testis yang terlihat adalah normal. Spermatozoa di dalam tubulus dijumpai dalam jumlah banyak. Sel-sel spermatogenik juga dijumpai dalam keadaan normal (Gambar 1). Demikian pula dengan kelompok perlakuan 0.25 mg/kg BB/h dan kelompok perlakuan 0.50 mg/kg BB/h. Tidak terjadi disorganisasi, tidak ada tanda-tanda kerusakan sel dan semua tahapan dari siklus seminiferus dapat dikenali dengan mudah. Sedangkan pada kelompok perlakuan 1.00 mg/kg BB/h dan kelompok

PENGARUH BAHAN

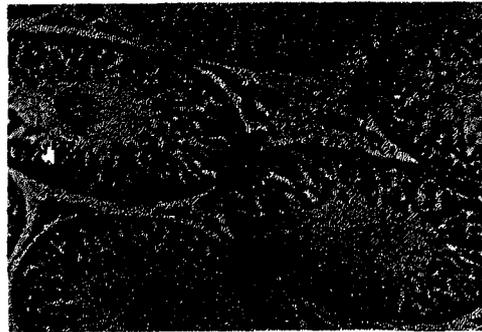
perlakuan 2.00 mg/kg BB/h terlihat pengurangan jumlah spermatozoa, sehingga lumen tampak kosong (Gambar 2 dan Gambar 3)



Gambar 1. Fotomikroskopik Penampang Melintang Testis Tikus Putih Kelompok Kontrol



Gambar 2. Fotomikroskopik Potongan Melintang Testis Tikus Putih Kelompok Perlakuan Sterol 1.00 mg/kg BB/h



Gambar 3. Fotomikroskopik Potongan Melintang Testis Tikus Putih Kelompok Perlakuan Sterol 2.00 mg/kg BB/h

PENGARUH BAHAN

Dari Gambar 1, Gambar 2 dan Gambar 3, terlihat spermatogonia tipe A dan spermatogonia tipe B. Spermatogonia tipe A mempunyai inti lonjong sedangkan spermatogonia tipe B mempunyai inti bulat yang mengandung massa kromatin padat yang berhubungan dengan membran inti dan terletak di sepanjang membran basalis. Rata-rata jumlah spermatogonia kelompok kontrol antara 40 hingga 50, sedangkan rata-rata jumlah spermatogonia pada kelompok perlakuan antara 35 hingga 45 per tubulus seminiferus. Berarti pemberian bahan sterol dalam biji lamtoro gung tidak mempengaruhi jumlah spermatogonia di dalam tubulus seminiferus.

Demikian pula dengan keberadaan sel Sertoli dan sel Leydig. Tidak terjadi disorganisasi, tidak ada tanda-tanda kerusakan sel dari semua tahap (tahap VII dan VIII) sehingga dapat dikenali dengan mudah.

Pada penelitian ini terlihat dua bentuk sel Sertoli yaitu sel dengan inti yang berbentuk perpendikular ataupun sel dengan inti yang berbentuk paralel. Berdasarkan pengamatan per tubulus seminiferus dijumpai sekitar 25 hingga 35 buah sel Sertoli, di mana jumlah dan bentuk yang diamati pada kelompok perlakuan kurang lebih sama dengan kelompok kontrol

Dengan kondisi sel Sertoli yang relatif normal, diharapkan proses terbentuknya ABP yang berperan untuk mengangkut testosteron menuju sel-sel target dalam tubulus berjalan lancar. Karena menurut Eftman (1953) apabila kondisi sel Sertoli mengalami involusi, maka akan mengakibatkan penghambatan proses spermatogenesis di dalam testis.⁵

Demikian juga halnya dengan sel Leydig yang terletak di antara tubulus seminiferus. Sel-sel Leydig pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terlihat tidak ada perbedaan yang berarti, baik dalam jumlah maupun bentuknya.

Membran basalis yang membungkus tubulus masih tampak normal, meskipun terlihat ada beberapa tubulus yang tidak memiliki membran basalis dalam keadaan utuh (bentuknya kurang sempurna).

Hal pertama yang dapat dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya efek depresi akibat pemberian bahan sterol yaitu dengan menimbang berat testis tikus putih. Berdasarkan perhitungan rata-rata berat testis, terjadi penurunan berat yang tidak bermakna antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan bahan sterol. Ada dugaan bahwa penurunan berat testis pada kelompok perlakuan dipengaruhi oleh perkembangan epitel seminiferus, yang ada di bawah pengaruh hormon gonadotropin FSH dan LH, di samping hormon androgen.

PENGARUH BAHAN

Pengaruh bahan sterol yang diisolasi dari biji lamtoro gung pada penelitian ini dihubungkan dengan perubahan-perubahan yang terjadi pada jaringan testis, akibat adanya zat-zat yang terkandung dalam biji lamtoro gung.

Pada penelitian ini tampak penurunan jumlah sel spermatosit primer dan spermatid bulat yang berbeda sangat bermakna, tanpa adanya perubahan pada struktur lain. Hal ini disebabkan oleh kerja sterol yang menghambat jalur hipotalamus-hipofisis-testis. Sehingga hormon testosteron yang dihasilkan oleh testis (lebih tepatnya di sel Leydig) menjadi terganggu. Hasilnya pematangan sel spermatogonia menjadi spermatosit primer juga terhambat. Demikian juga untuk proses pematangan sel spermatosit primer menjadi spermatid bulat dan seterusnya hingga menjadi spermatozoa.

Hal ini juga didukung dengan pengamatan secara langsung, dan ternyata tetap terjadi proses reproduksi (*mating*) antara tikus putih jantan dan betina. Berarti libido pada tikus putih tidak dipengaruhi oleh bahan sterol dalam biji lamtoro gung.

Kesimpulan

Pemberian bahan sterol 1.00 mg/kg BB/h dan 2.00 mg/kg BB/h menyebabkan penurunan jumlah spermatosit primer, jumlah spermatid bulat dan diameter tubulus seminiferus pada testis tikus putih.

Berdasarkan pengamatan perilaku terhadap tikus putih, ternyata pemberian bahan sterol hingga 2.00 mg/kg BB/h tidak menyebabkan penurunan libido.

Kepustakaan

1. Adimunca, C., *Kemungkinan pemanfaatan ekstrak buah pare sebagai bahan kontrasepsi pria*, Cermin Dunia Kedokteran 112 : 12 – 15, 1996.
2. Astika, G.N., *Perspektif kontrasepsi herbal pria*, Kongres Nasional V, PANDI. Surabaya, 1991.
3. Clermont, Y. and B. Perey, *Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats*, The American Journal of Anatomy 100 (2) : 241, 1957.
4. de Kretser, *Fertility regulation in the male*, Bulletin of the world Health Organization 56 (3) : 353, 1979.
5. Eftman, H., *The Sertoli cell and testis structure*, American Journal Anatomy 113: 25 – 33, 1953.

6. Ferdinandus, I.A., *Spermatogenesis ditinjau dari segi histologi*, Prosiding Seminar Spermatogenesis. Hal. 1 – 20, 1980.
7. Hardjowijoto, S., *Kontrasepsi mantap pria*, Seminar Keluarga Berencana Mutakhir, Surabaya, 1992.
8. Kuczynski, H.J., *Family planning program male responsibility*, International Congres. P. 143 – 147, 1982.
9. Priastini dkk., *Efek toksik daun lamtoro terhadap organ reproduksi mencit jantan*, Prosiding Seminar Teknologi Veteriner. Bogor, 1995.
10. Rahayu, S., *Aktivitas antifertilitas ekstrak biji lamtoro gung dan pengaruhnya terhadap ginjal dan hepar mencit*, Tesis Program Pascasarjana, UNAIR Surabaya, 1994.
11. Sarmanu, *Histologis dan ultrastruktur testis tikus putih yang diberi pakan mengandung biji lamtoro gung*, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, 1988.
12. Sethi, P. and P.R. Kulharni, *Leucaena leucocephala a nutrition profile food*, Food and Nutrition Bulletin. Internet, 1995.
13. Soeradi, O., *Penelitian pada beberapa tanaman yang diduga mempunyai efek samping kontrasepsi*, BIDI VII (15) : 8, 1986.
14. Steel, R.G.D. and J.H. Torrie, *Prinsip-prinsip dan prosedur statistika*. Terjemahan B. Sumantri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 1991.
15. Susanti, J.S., *Isolasi sterol dari biji lamtoro gung*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, 1986.
16. Telek dkk., *Solanum mammosum as a source of solasodin in the lowland tropics*, Economic Botany 31 : 120 – 128, 1971.