

**Uji Fertilitas Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Setelah Paparan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica*)****Study of Male Rats (*Rattus norvegicus*) Fertilty After Treated by Ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) Leaves Extract****Agung Janika Sitaswi\*, Tyas Rini Saraswati, Faisal Mahmud Alauddin**

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jl. Prof Jacob Rais, Tembalang, Semarang 50275

\*Email: agssiwi@yahoo.co.id

Diterima 13 Januari 2023 / Disetujui 27 Maret 2023

**ABSTRAK**

Daun mimba (*Azadirachta indica*) mengandung senyawa antifertilitas yang mempengaruhi reproduksi, baik pada jantan atau betina. Penelitian ini bertujuan menguji ekstrak etanol daun mimba (*A. indica*) terhadap fertilitas tikus jantan dengan mengamati bobot testis, rasio kebuntingan, jumlah anak dan penurunan jumlah anak. Penelitian eksperimental dilakukan dengan rancangan acak lengkap menggunakan 32 ekor tikus jantan dan 36 ekor tikus betina. Hewan uji dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing dengan 6 ulangan. Kelompok P0 adalah kelompok kontrol, hewan uji yang hanya diberi akuades, sedangkan P1, P2 dan P3 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 60, 80 and 100 mg/kgBB/hari, secara oral, dengan volume 1ml selama 14 hari. Bobot testis ditentukan sehari setelah perlakuan berakhir, dengan pembedahan dan mengisolasi testis dari separuh dari total hewan uji. Separuh hewan uji yang lain digunakan untuk uji kawin dengan cara menggabungkan hewan uji jantan pada setiap kelompok perlakuan dengan hewan uji betina. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata ( $p > 0,05$ ) bobot testis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, tetapi terjadi perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) pada rasio kebuntingan, jumlah anak dan persentase penurunan jumlah anak yang dihasilkan. Kesimpulan penelitian ini adalah paparan ekstrak etanol daun mimba selama 14 hari menurunkan fertilitas tikus putih.

*Kata kunci : bobot testis; antifertilitas; rasio kebuntingan*

**ABSTRACT**

Neem leaves (*Azadirachta indica*) contain antifertility compounds that able to disturb the reproductive process, both on male and female. This study purposed to examine the ethanolic extract of Neem leaves on male rat fertility which evaluated by testicular weight, pregnancy ratio, litter size decrease. This study is using a completely randomized design, with 32 males and 36 female rats which were divided into 4 treatment groups with 6 replicates on each. The P0 group is treated with aquadest only; the P1, P2, and P3 group are treated with ethanolic Neem leaves extract 60, 80 and 100 mg/kgBW/day. The treatment are given orally with 1 ml in volume, for 14 consecutive days. The testicular weight of every animal in every group were observed a day after the last treatment. The other animals of every treated group were continued with mating test. The result showed that there were no significant differences ( $P > 0,05$ ) in the testicular weight between control and treated groups, but there were significant differences ( $P < 0,05$ ) on pregnancy ratio, litter size and the percentage of litter size decrease. It could be concluded that the rat fertility were decreased by ethanolic neem leaves extract for 14 consecutive days.

*Keywords : testicular weight; antifertility; pregnancy ratio*

## PENDAHULUAN

Perkembangbiakan tikus terjadi dengan pesat, karena dalam setahun dapat mengalami kebuntingan lebih dari 10 kali dengan 15 anak per kelahiran (Akbar, 2010). Laju reproduksi tikus yang tinggi dapat ditekan melalui pengendalian fertilitas menggunakan beberapa sediaan, baik alami maupun sintetis. Tanaman mimba (*Azadirachta indica*) merupakan salah satu jenis tanaman yang diyakini dapat digunakan sebagai pengatur fertilitas, baik pada hewan jantan maupun betina (Priya *et al.*, 2012). Daun mimba mengandung senyawa flavonoid, triterpenoid dan saponin yang berpotensi sebagai antifertilitas (Aradilla, 2009; Suryawanshi, 2011; Auta and Hasan, 2016). Saponin digunakan sebagai bahan dasar sintesis beberapa hormon steroid untuk bahan kontrasepsi oral (Apolonia & Sukarjati, 2017). Flavonoid dan terpenoid merupakan senyawa bioaktif yang berpengaruh terhadap infertilitas hewan jantan dan betina (Morovati *et al.*, 2008).

Senyawa antifertilitas pada daun mimba bekerja melalui efek hormonal, efek sitotoksik, dan sitostatik yang menghambat laju metabolisme sel spermatozoa dengan cara mengganggu keseimbangan sistem hormonal (Avycena dkk., 2020). Mekanisme efek kerja senyawa antifertilitas pada spermatozoa tikus jantan ditunjukkan dengan mengecilnya volume nukleus dan sitoplasma dari sel-sel sertoli. Degenerasi nukleus yang terjadi pada spermatosit dan spermatid mengakibatkan proses spermatogenesis terganggu (Manivannan, 2009). Efek sitotoksik ekstrak etanol daun mimba pada penelitian Avycena dkk. (2020) menyebabkan gangguan perkembangan spermatozoa yang ditunjukkan dengan penurunan indeks spermatogenik pada tubulus semeniferus mencit. Penelitian Saputra dkk. (2020) membuktikan bahwa penurunan indeks gonadosomatik pada tikus jantan setelah diberi paparan ekstrak etanol daun mimba selama 14 hari dengan dosis 100mg/kgBB/hari selama 14 hari berbeda tidak nyata dengan kelompok kontrol. Oyeyemi and Fayomi (2022) menyatakan bahwa indeks gonadosomatik berhubungan dengan potensi menghasilkan individu baru. Shah and Jhade (2018) menyatakan bahwa evaluasi efek antifertilitas dapat

dilakukan dengan mengamati persentase kebuntingan dan jumlah anak yang dihasilkan. Firdaus (2017) menyatakan bahwa fertilitas dapat ditentukan dengan menghitung terjadinya kebuntingan, jumlah, dan rasio jenis kelamin anak setelah pemberian bahan uji tertentu.

Penelitian ini dilakukan untuk menguji apakah pemberian ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) selama 14 hari dapat mempengaruhi fertilitas tikus jantan yang diamati melalui bobot testis, rasio kebuntingan, dan jumlah anak setelah paparan bahan uji selama 14 hari. Hasil penelitian ini diharapkan melengkapi informasi mengenai potensi ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) sebagai sediaan antifertilitas untuk menekan laju reproduksi mamalia sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan pengendali reproduksi mamalia, terutama mamalia yang berpotensi sebagai hama atau reservoir penyakit.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan selama 2,5 bulan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Universitas Diponegoro. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 8 kali ulangan.

### Persiapan Hewan Uji

Hewan uji penelitian yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dan betina dengan umur 2 bulan, dengan rata-rata bobot badan 200g. Tikus dipelihara dalam kandang pemeliharaan dengan kondisi yang terkontrol. Aklimasi hewan uji dilakukan selama 2 minggu, sebelum pemberian bahan uji dimulai. Selama aklimasi hewan uji diberi pakan standard dan air minum secara *ad libitum*.

### Ekstraksi Daun Mimba

Sampel daun mimba yang akan digunakan berupa sampel segar yang diperoleh dari area kampus FSM UNDIP. Sampel daun segar dibersihkan dan dikeringkan menggunakan oven selama  $\pm 4$  hari. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan blender. Metode ekstraksi

didasarkan pada penelitian Sitasiwi *et al.* (2018). Ekstraksi dilakukan dengan mencampurkan 100 g sampel dengan 1000 ml etanol 70%. Larutan diaduk secara teratur dan didiamkan pada suhu ruang selama 24 jam. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan evaporator sampai didapatkan hasil akhir dalam bentuk serbuk.

### Persiapan dan Pemberian Bahan Uji

Dosis yang diuji pada penelitian ini yaitu: 60, 80, 100 mg/kgBB/hari. Ekstrak etanol daun mimba diberikan dalam bentuk larutan, dibuat dengan cara melarutkan ekstrak dalam akuades hangat. Pemberian bahan uji dilakukan secara oral dengan volume 1ml/ekor, selama 14 hari, dengan waktu pemberian diantara 15.30 - 16.30 WIB.

### Pengambilan Data Penelitian

Parameter utama yang diamati adalah bobot testis, rasio kebuntingan, dan jumlah anak. Pembedahan hewan uji dilakukan setelah perlakuan berakhir, yaitu hari ke-14. Sampel testis diperoleh dari 4 ekor hewan uji, sedangkan 4 ekor hewan uji yang lain pada setiap kelompok perlakuan digunakan untuk uji kawin. Isolasi testis dilakukan dengan pembedahan pada bagian bawah abdomen, setelah hewan uji dianestesi menggunakan chloroform.

Uji kawin hewan uji dilakukan dengan cara menggabungkan hewan jantan pada kandang yang berisi hewan betina virgin. Penggabungan ini dilakukan pada malam hari, selama tiga hari berturut-turut. Hari ke-0 kebuntingan ditentukan dengan melihat *vaginal plug* pada hewan betina sebagai tanda bahwa hewan tersebut telah kawin. Rasio kebuntingan ditentukan dengan rumus (Shah and Jshade, 2018) sebagai berikut:

$$\frac{\sum \text{betina yang bunting}}{\sum \text{yang dikawinkan}} \times 100 \%$$

Jumlah anak ditentukan pada saat kebuntingan berakhir, yaitu pada saat hewan uji betina melahirkan (Shah and Jshade, 2018).

### Analisis Data

Data bobot testis dianalisis dengan ANOVA dengan taraf signifikansi 5%. Data rasio kebuntingan serta penurunan jumlah anak dianalisis secara deskriptif.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap fertilitas tikus (*Rattus norvegicus*) dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa pengaruh pemberian ekstrak etanol daun mimba menunjukkan bobot testis yang berbeda tidak nyata ( $P > 0,05$ ) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun mimba yang diberikan selama 14 hari tidak memengaruhi bobot testis tikus.

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak terjadi penurunan bobot testis, hal ini dapat diduga karena waktu paparan bahan uji yang relatif singkat sehingga tidak mempengaruhi proses spermatogenesis pada tikus. Hal tersebut menyebabkan bobot testis tidak menunjukkan perbedaan nyata pada hewan uji kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Spermatogenesis pada tikus dapat diketahui dari umur reproduktif pada tikus. Sengupta (2013) menyatakan bahwa fase kematangan seksual atau pubertas pada tikus mulai terjadi pada umur 6 minggu (40–60 hari), sedangkan fase pradewasa terjadi saat umur 63–70 hari. Nugroho *et al.* (2022) menyatakan bahwa tikus umur 8–9 minggu merupakan tikus dewasa yang telah matang seksual, sedangkan tikus yang berumur lebih dari 9 minggu sudah memiliki status reproduksi yang matang, stabil, dan siap kawin. Hal ini menjelaskan bahwa aktivitas spermatogenesis dimulai pada umur 7 minggu (fase dewasa awal) dan terus dipertahankan pada umur-umur selanjutnya (fase dewasa). Penelitian ini dilakukan pada saat hewan uji berumur 8-9 minggu sehingga diduga pemberian bahan uji dengan waktu paparan 14 hari menyebabkan pengaruh yang tidak nyata ( $p > 0,05$ ).

Ukuran molekul bahan uji juga diduga menjadi penyebab bobot testis menunjukkan perbedaan tidak nyata. Ukuran molekul yang relatif besar menyebabkan senyawa aktif dalam bahan uji diduga tidak dapat menembus *blood-testis barrier*

sehingga tidak mempengaruhi spermatogenesis yang menyebabkan bobot testis tidak berubah. Hal tersebut sesuai pendapat Napsah dan Wahyuningsih (2014) yang menyatakan bahwa senyawa-senyawa tertentu tidak dapat sampai ke jaringan target

karena ukuran molekul yang relatif besar. Mekanisme tersebut diduga menjadi penyebab terjadinya penurunan laju spermatogenesis sehingga bobot testis menunjukkan perbedaan tidak nyata, seperti disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata bobot testis, rasio kebuntingan serta penurunan jumlah anak tikus setelah paparan ekstrak etanol daun mimba selama 14 hari

Parameter	P0 $\bar{x} \pm SD$	P1 $\bar{x} \pm SD$	P2 $\bar{x} \pm SD$	P3 $\bar{x} \pm SD$
Bobot testis (g)	1,11 $\pm$ 0,17	1,2 $\pm$ 0,18	1,02 $\pm$ 0,16	1,18 $\pm$ 0,11
Rasio kebuntingan	55,5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1	44,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	33,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	22,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2
Jumlah anak per kelahiran	9 $\pm$ 0,3	6 $\pm$ 0,3	7 $\pm$ 0,3	6 $\pm$ 0,2
Penurunan jumlah anak (%)	71,77 <sup>b</sup> $\pm$ 0,33	47,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	55,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13	47,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,17

Keterangan:

Rerata pada baris yang sama, yang diikuti superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

P0: Kelompok kontrol dengan paparan dengan akuades 1ml/ekor/hari

P1: Kelompok perlakuan dengan paparan ekstrak etanol daun mimba 60mg/kgBB/hari

P2: Kelompok perlakuan dengan paparan ekstrak etanol daun mimba 80mg/kgBB/hari

P3: Kelompok perlakuan dengan paparan ekstrak etanol daun mimba 100mg/kgBB/hari

Tabel 1. menunjukkan bahwa pada hewan uji kelompok kontrol (P0) mengalami tingkat kebuntingan paling tinggi yaitu sebesar 55,5% sedangkan pada kelompok P1, P2, dan P3 menunjukkan presentase secara berurutan sebesar 33,3%, 44,4%, dan 22,2%. Hasil ini menunjukkan penurunan yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan presentase kebuntingan paling rendah terjadi pada perlakuan P3 yaitu dengan hasil sebesar 22,2%. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun mimba dapat memengaruhi proses terjadinya fertilisasi yang mengawali terjadinya kebuntingan pada hewan uji betina. Penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis bahan uji dapat menyebabkan presentase kebuntingan yang semakin rendah.

Penurunan rasio kebuntingan yang terjadi dalam penelitian ini diduga disebabkan oleh efek sitotoksik yang mengganggu hormonal dalam tubuh sehingga menyebabkan gangguan pada saluran reproduksi hewan jantan yang berperan mensekresi cairan penyusun semen. Hal ini diduga disebabkan oleh efek sitotoksik yang terdapat pada ekstrak etanol daun mimba yang menyebabkan gangguan sekresi senyawa yang berperan sebagai media hidup spermatozoa dalam saluran reproduksi

jantan sehingga dapat mempengaruhi struktur spermatozoa yang selanjutnya menyebabkan penurunan kemampuan fertilisasi. Seriana *et al.* (2019) juga menyatakan bahwa ekstrak daun mimba dapat menurunkan kemampuan spermatozoa untuk memfertilisasi. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Naik *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa kerusakan struktur spermatozoa oleh efek sitotoksik juga akan mempengaruhi motilitas dan kualitas spermatozoa pada tikus yang menyebabkan perbedaan kecepatan dan pergerakan sel sperma dalam membuahi sel telur.

Khanal (2021) menyatakan bahwa daun mimba mengandung senyawa flavonoid, triterpenoid dan saponin yang berpotensi sebagai antifertilitas. Laoung-on *et al.* (2021) menyatakan bahwa senyawa saponin dan flavanoid bersifat sitotoksik yang menyebabkan penurunan jumlah sel spermatozoa. Senyawa flavanoid dapat merangsang pembentukan esterogen pada mammalia yang akan memberikan umpan balik negatif terhadap poros hipotalamus-hipofisis-testis sehingga akan menurunkan sekresi LH dan FSH. Khatimah dkk. (2021) menyatakan bahwa penurunan FSH dan LH dapat menekan pembentukan testosteron secara langsung pada sel Leydig, sehingga terjadi gangguan keseimbangan

hormonal yang menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa yang dihasilkan. Abnormalitas spermatozoa dapat mempengaruhi kemampuan fertilisasi sehingga berpengaruh pada rasio kebuntingan pada hewan uji yang dikawinkan.

Hasil penelitian terhadap parameter jumlah anak menunjukkan hasil yaitu berkisar 9 ekor untuk kelompok kontrol dan 7-6 ekor untuk kelompok perlakuan. Fajriati *et al.* (2019) menyatakan bahwa rerata jumlah anak pada tikus strain Wistar adalah  $12,55 \pm 2,00$ . Hewan uji pada kelompok kontrol hanya menghasilkan sekitar rerata 9 anak per kelahiran atau sekitar 71,77 % dari jumlah rerata anak tikus pada strain yang sama. Perbedaan tersebut diduga karena perbedaan lingkungan atau jenis pakan yang digunakan dalam pemeliharaan hewan uji.

Hewan uji kelompok perlakuan berkisar 6-7 anak per kelahiran atau sekitar 47,8% - 55,8% dari rerata normal jumlah anak per kelahiran pada penelitian Fajriati *et al.* (2019). Hasil perbandingan dengan jumlah anak pada kelompok kontrol dalam penelitian ini, persentase penurunan jumlah anak pada hewan uji kelompok perlakuan berkisar 22,2 - 33,3 %. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun mimba yang diberikan selama 14 hari memberikan pengaruh yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kemampuan jumlah spermatozoa yang mampu memfertilisasi sel telur sehingga menyebabkan penurunan jumlah anak yang dihasilkan. Shah and Jade (2018) menyatakan bahwa salah satu penyebab penurunan jumlah anak adalah senyawa antifertilitas dalam sediaan yang diberikan.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan fertilitas tikus jantan mengalami penurunan setelah pemberian ekstrak etanol daun mimba sampai dosis 100 mg/kgBB selama 14 hari.

## DAFTAR PUSTAKA

Akbar, B. (2010). *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. UIN Jakarta: Adabia Press.

Apolonia M. dan Sukarjati. (2017). Pengaruh

ekstrak biji pepaya (*Carica papaya* L.) dan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.juss) dan campuran ekstrak biji pepaya (*Carica papaya* L.) dan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.juss) terhadap diameter tubulus seminiferus, sel leydig dan bobot testis mencit (*Mus musculus*). *Stigma Journal of Science* 10 (1): 5-11.

Auta, T. and A.T. Hassan. (2016). Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of *Azadirachta indica* (Neem) on male albino mice. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. X(x): 1-5.

Avycena, S., A.J. Sitaswi, S.M. Mardiaty. (2020). Struktur tubulus seminiferus mencit (*Mus musculus* L) setelah paparan ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). *Pro-Life*. (7)1: 42-48.

Fajriati, I., H. Riza, F. Nugraha, F. Irianto. (2019). The Teratogenic Effects of Ethanolic Extract of Bintangur leaves (*Calophyllum soulattri* Burm. F) on Female White Rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 12(8): 160-163.

Khanal, S. (2021). Qualitative and Quantitative Phytochemical Screening of *Azadirachta indica* Juss Plant Parts. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* Vol 9(2): 122-127.

Khatimah, H., L. Rosida, S. Kaidah, I. Yuliana. (2021). Effect of Ethanolic Extract of Karamunting Leaf (*Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) on Testosterone Level of Diabetes Mellitus Model Rats. *Jurnal Profesi Medika*. 15(2): 157-165.

Laoung-on, J., C. Jaikang, K. Saenphet, and P. Sudwan. (2021). Phytochemical Screening, Antioxidant and Sperm Viability of *Nelumbo nucifera* Petal Extracts. *Plants*. 10 (7): 1375-1595.

Manivannan, B. (2009). Sperm characteristics and ultrastructure of testes of rats after long-term treatment with the methanol subfraction of *Carica papaya* seeds, *A. J. Androl.* 11: 583-559.

Morovati, M., M. Mahmond, K. M. Ghazy. (2008). Sterility and Abortive Effect of the Commercial Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Extract Neem Azal-T/S on Female Rat (*Rattus norvegicus*). *Turk.J.Zool.* 32: 155-16.

Naik, B.S., N.B. Dhang, H.P. Sapkota, N. Wagle, S. Nagarjuna, R. Sankaranand, B.A. Kumari. (2016). Phytochemical screening and evaluation of anti-fertility activity of *Dactyloctenium aegyptium* in male albino

- rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5(1): 51-57.
- Napsah, R. and I. Wahyuningsih. (2014). Preparation of chitosan-Tpp/nanoparticles ethanol extract of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) with ionic gelation method. *J. Pharm. Sci. Commun.* 11:7-12.
- Nugroho, R., R. Aryani, H. Manurung, D.F. Anindita, F.S.N. Hidayati, W. Prahastika. (2022). Effects of the Ethanol Extracts of *Ficus deltoidea* leaves on the Reproductive Parameters in Male Mice. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 10(A):146-152.
- Oyeyemi, M.O. and A.P. Fayomi. (2011). Gonadosomatic Index and Spermatozoa Morphological Characteristics of Male Wistar Rats Treated with Graded Concentration of Aloe Vera Gel. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*. 3(2): 47-53.
- Priya G.K., Saravanan, and C. Renuka. (2012). Medicinal Plants With Potential Antifertility Activity-A review Of Sixteen Years of Herbal Medicine Research (1994-2010). *Int.J. PharmTech Res.*4: 485-488.
- Saputra, A.R., T.R. Saraswati, A.J. Sitasiwi. (2020). Gonadosomatic Index Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*) setelah Paparan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica*) sebagai Senyawa Antifertilitas. *Jurnal Pro-Life*. Vol.7 (3): 288-298.
- Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 4(6): 624–630.
- Seriana, I., M. Akmal, Darusman and S. Wahyuni. (2019). Neem leaves extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on male reproductive system: a mini-review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol. 399. 012106.
- Shah, S.K. and D.N. Jhade. (2018). Evaluation of antifertility potential of *Piper betle* (Petiole) on female wistar rats “rising approaches of herbal contraception. *Biochem. Bio.Phys. Rep.* 15: 97-102.
- Sitasiwi, A.J. (2018). Bobot Badan Mencit (*Mus musculus* l.) setelah Pemberian Ekstrak Ethanol Daun Nimba (*Azadirachta indica*) secara Oral Selama 21 Hari. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 3 (1) : 133-139.
- Suryawanshi, J..S. (2011). Neem- natural contraceptive for male and female an overview. *Int. J. Biomol and Biomed.* 1:1-6.