

## **Toksisitas Reproduksi Buah Luwigan (*Ficus hispida* L.f.) pada Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Jantan Galur Wistar**

### **Reproductive Toxicity of Hairy Fig (*Ficus hispida* L.f.) Fruits on Male Wistar Rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)**

**Laksmindra Fitria<sup>1,\*</sup>, Lisa Handayani<sup>1</sup>, Lina Noor Na'ilah<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia;

\*Corresponding Author: [laksmindraf@ugm.ac.id](mailto:laksmindraf@ugm.ac.id)

**Abstract:** Previous studies revealed that hairy fig fruits (HFF) are safe to consume or no-observed-adverse-effect level (NOAEL). No animals died following oral administration of unripe fruit (HFUFF) or ripe fruit (HFRFF) filtrate, as well as no signs of toxicity leading to sublethal effects. However, the effect of HFF on reproductive physiology has not been conducted. This research aimed to investigate toxic effects of HFUFF or HFRFF on male reproductive system of Wistar rats, specifically spermatogenesis, spermatozoa, and relative weight of testis and accessory sex glands. Procedure referred to OECD TG 421 with some modifications based on results of previous studies. Nine rats were assigned into three groups: HFUFF, HFRFF, and Control/placebo. Each filtrate or distilled water was given orally 2 mL/individual/day for 77 days. Data were statistically analyzed based on one-way ANOVA ( $\alpha=0.05$ ). HFUFF increased values of almost all parameters. HFRFF also improved values of some parameters, but reduced spermatogenesis index and lowered the percentage of spermatozoa with normal morphology. Animals in Control group gained the most weight and visceral fat mass. It can be concluded that HFUFF did not generate negative effects on male reproductive system of Wistar rats, in fact improved its performance. Meanwhile, HFRFF demonstrated the opposite result from HFUFF. Therefore, consumption of HFRFF must be considered. Both filtrates suppressed weight gain and reduced fat deposits, although insignificant, indicating that they may possess antiobesity properties. Further research related to the potential of HFF on reproductive profile and antiobesity is required.

**Keywords:** *Ficus hispida*; reproductive toxicity; spermatogenesis; spermatozoa; Wistar rat

**Abstrak:** Kajian praklinis toksisitas oral akut menyatakan bahwa buah luwigan aman dikonsumsi karena tidak menunjukkan adanya efek samping (NOAEL). Tidak ada hewan coba yang mati setelah pemberian *per oral* filtrat buah luwigan muda (FBLMU) atau matang (FBLMA), serta tidak ada efek subletal yang mengarah pada tanda-tanda ketoksikan. Potensi FBLMU dan FBLMA terhadap fungsi reproduksi jantan belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek toksik FBLMU dan FBLMA pada fungsi reproduksi jantan menggunakan model tikus Wistar dengan parameter: spermatogenesis, spermatozoa, serta berat relatif testis dan kelenjar-kelenjar kelamin aksesoris. Prosedur penelitian mengacu pada OECD TG 421 dengan beberapa modifikasi berdasarkan hasil penelitian sebelumnya. Sembilan ekor tikus dikelompokkan menjadi tiga: dicekok FBLMU, dicekok FBLMA, dan dicekok air suling sebagai Kontrol/plasebo, masing-masing sebanyak 2 mL/individu/hari selama 77 hari. Data dianalisis secara statistik berdasarkan *one-way* ANOVA ( $\alpha=0,05$ ). Hasil menunjukkan bahwa FBLMU meningkatkan nilai pada hampir semua parameter. Sementara itu, FBLMA meningkatkan nilai pada beberapa parameter lain, namun menurunkan indeks spermatogenesis dan persentase spermatozoa dengan morfologi normal. Kontrol mengalami peningkatan berat badan dan massa lemak visceral terbanyak dibandingkan kelompok yang dicekok buah luwigan. Dapat disimpulkan bahwa FBLMU tidak menimbulkan efek negatif pada fungsi reproduksi jantan tikus Wistar, bahkan meningkatkan kinerjanya. Sementara itu, konsumsi FBLMA harus diperhatikan karena adanya efek negatif. Kedua filtrat menekan pertambahan berat badan dan mengurangi timbunan lemak sehingga berpotensi sebagai antiobesitas. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terkait potensi buah luwigan terhadap profil reproduksi dan antiobesitas.

Kata kunci: *Ficus hispida*; toksisitas reproduktif; spermatogenesis; spermatozoa; tikus Wistar

Dikirim: 20 Maret 2022

Direvisi: 18 April 2022

Diterima: 24 April 2022

Dipublikasikan: 29 April 2022

## Pendahuluan

*Ficus* berupa pohon berukuran sedang yang mudah tumbuh secara liar di berbagai habitat sehingga tersebar di seluruh wilayah tropis dan subtropis di dunia. Salah satu genus dari Familia Moraceae ini memiliki lebih dari 750 spesies (Ali & Chaudary, 2011; Lansky & Paavilainen, 2011; Chaudary *et al.*, 2012). Namun demikian baru sebagian kecil saja yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dunia, baik sebagai bahan makanan maupun obat tradisional untuk berbagai penyakit (Lansky & Paavilainen, 2011; Chaudary *et al.*, 2012).

Tin atau ara (*F. carica*) adalah spesies yang paling banyak dikonsumsi. Selain karena cita rasa yang segar dan lezat, buah ini juga kaya manfaat, antara lain memiliki aktivitas antikanker, hepatoprotektif, hipoglikemik, hipolidemik, profertilitas, dan antimikrobia (Lansky & Paavilainen, 2011; Mawa *et al.*, 2013; Bakar *et al.*, 2020). Tidak semua buah spesies *Ficus* dapat dikonsumsi. Sebagai contoh *F. lyrata*. Meskipun tidak toksik, buahnya tidak dapat dikonsumsi langsung namun dapat dimanfaatkan untuk mengawetkan daging ayam (Wira *et al.*, 2020). Sementara itu, *F. exasperata* yang telah banyak dimanfaatkan oleh penduduk Afrika sebagai obat tradisional ternyata bersifat toksik jika dikonsumsi dalam jangka panjang (Bafor & Igbinuwen, 2009).

*F. hispida* atau luwungan kurang populer dibandingkan *F. carica*, namun demikian di negara-negara Asia Barat buah ini telah lama dikonsumsi sebagai bahan makanan dan obat, baik untuk manusia (Ali & Chaudary, 2011), maupun ternak (Kunwar & Bussmann, 2006). Serangkaian kajian toksisitas oral akut dan skrining keamanan mengkonsumsi buah luwungan telah dilakukan oleh Fitria dkk. (2019), Fitria dkk. (2020), dan Fitria dkk. (2021). Hasil menunjukkan bahwa buah luwungan muda dan matang yang diberikan kepada tikus Wistar jantan dan betina dalam bentuk filtrat tidak berdampak negatif terhadap kondisi fisiologis dan kesehatan secara umum. Namun demikian,

kajian secara spesifik terhadap sistem reproduksi belum pernah dilakukan. Suatu agen dapat berdampak negatif terhadap sistem reproduksi tanpa memunculkan tanda-tanda ketoksikan. Sebagai contoh *F. bengalensis* yang menekan spermatogenesis serta menurunkan kualitas spermatozoa dan fertilitas padahal saat dilakukan pengujian toksisitas umum tidak menunjukkan manifestasi klinis apapun atau *no-observed-adverse-effect level* (NOAEL) (Gupta, 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian *per oral* filtrat buah luwungan muda dan matang terhadap fungsi reproduksi jantan dengan model tikus Wistar. Parameter yang diamati meliputi: aktivitas spermatogenesis, kuantitas dan kualitas spermatozoa, serta berat relatif testis dan kelenjar-kelenjar kelamin tambahan (vesikula seminalis dan prostat).

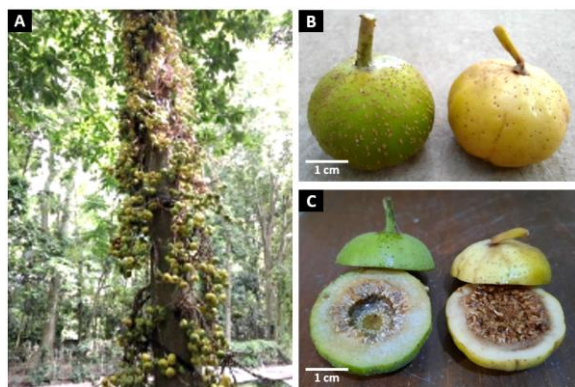
## Bahan dan Metode

### Hewan coba

Hewan coba berupa sembilan ekor tikus jantan galur Wistar umur 8 minggu dengan berat badan awal 124–147 g ( $138 \pm 7$  g), diperoleh dari Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada (UGM). Pemeliharaan dan percobaan dilakukan di fasilitas hewan *Animal Room* Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi, UGM. Sebelum percobaan dimulai, tikus diaklimasi selama satu pekan. Prosedur pemeliharaan yang meliputi pengandangan, pemberian pakan dan air minum, pemantauan kesehatan, parameter lingkungan pemeliharaan, dan sanitasi mengacu pada panduan standar pemeliharaan tikus laboratorium (NRC, 2011). Semua prosedur yang berkaitan dengan penanganan dan perlakuan hewan coba dalam penelitian ini telah disetujui oleh Komisi *Ethical Clearance* Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM, dengan diterbitkannya Surat Keterangan Kelaikan Etik No: 00100/04/LPPT/VIII/2018.

## Bahan uji

Bahan uji berupa buah luwungan muda dan matang, dipetik langsung dari pohon yang tumbuh di lingkungan Fakultas Biologi UGM dengan titik koordinat GPS 7°45'58.13"S - 110°22'32.76"E (**Gambar 1A**). Identifikasi spesies berdasarkan karakter morfologis sesuai Backer & van den Brink (1965) dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, UGM, dan dinyatakan sebagai *Ficus hispida* berdasarkan Surat Keterangan No: 0141073/S.Tb./IX/2021.



**Gambar 1.** Luwungan (*Ficus hispida* L.f.). Dokumentasi pribadi. Keterangan: **A.** Pohon yang sedang berbuah, **B.** Buah muda (kiri) dan buah matang (kanan), **C.** Buah yang dibelah.

Pembuatan filtrat dimulai dengan memilih buah dengan kriteria: buah muda berwarna hijau dengan tekstur keras, sedangkan buah matang berwarna kuning dengan tekstur lunak dan berair. Selain itu buah memiliki morfologi yang baik/sehat, tidak ada cacat/luka karena infeksi serangga (**Gambar 1B**). Buah selanjutnya dicuci bersih dengan air mengalir, dibelah untuk dibersihkan bagian dalamnya (**Gambar 1C**), kemudian dilumatkan menggunakan *blender*. Filtrat murni (100%) disaring dan segera diberikan pada hewan coba karena filtrat cepat sekali teroksidasi, ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi lebih gelap (Fitria dkk., 2019; Fitria dkk., 2020; Fitria dkk., 2021).

## Rancangan percobaan

Tikus dibagi menjadi tiga kelompok: Kelompok 1 dicekok filtrat buah luwungan muda (FBLMU), kelompok 2 dicekok filtrat buah luwungan matang (FBLMA), kelompok 3

dicekok air suling sebagai Kontrol/plasebo. Volume pencekokan FBLMU, FBLMA, atau air suling adalah 2 mL/individu/hari. Percobaan berlangsung selama 77 hari atau 1,5× siklus spermatogenesis. Pada tikus dibutuhkan waktu 52 hari untuk menyelesaikan perkembangan dari spermatogonia menjadi spermatozoa (Freitas *et al.*, 2002; Ahmadina *et al.*, 2007; Opuwari & Monsees, 2020).

## Pengambilan data

Berat badan (g) dan suhu badan (°C) diukur setiap pekan. Pemantauan kesehatan dan tanda-tanda ketoksikan diamati setiap hari berdasarkan penampilan fisik, perilaku, konsumsi makan dan minum, serta kondisi feses (Fitria dkk., 2019; Fitria dkk., 2020; Fitria dkk., 2021; Fitria *et al.*, 2022). Pada hari ke-78, hewan dikorbankan dengan cara anestesi menggunakan *cocktail* Ketamine-Xylazine (K= 100 mg/kg bb, X= 10 mg/kg bb), volume 0,1 mL/100 g bb melalui rute intramuskular dilanjutkan dengan eksanguinasi intrakardiak (IACUC IOWA, 2020). Testis, kelenjar-kelenjar kelamin tambahan (vesikula seminalis dan prostat), serta jaringan lemak visceral diambil untuk perhitungan berat relatif atau indeks organ (%) berdasarkan rumus oleh Fitria dkk. (2015):

$$\frac{\text{Berat organ (g)}}{\text{Berat badan (g)}} \times 100$$

Testis selanjutnya dibuat sediaan histologis metode parafin dengan fiksatif NBF 10% dan pewarnaan H&E untuk penghitungan sel-sel spermatogenik yang terdiri atas: spermatogonia, spermatisit, dan spermatid pada tubuli seminiferi stadium VII (Fitria dkk, 2015). Selain itu dihitung indeks spermatogenesis berdasarkan rumus oleh Shubina & Dudenkova (2016):

$$\frac{\Sigma \text{sel - sel spermatogenik}}{\text{jumlah tubuli seminiferi}}$$

Semen di dalam vas deferens dikeluarkan dengan cara diurut kemudian ditambahkan 2 mL garam fisiologis (NaCl 0,9%) bersuhu 35°C. Sebagian larutan semen tersebut digunakan untuk penghitungan konsentrasi spermatozoa ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) menggunakan bilik hitung *double-*

*improved Neubauer* berdasarkan rumus oleh API (2010):

$$\frac{\text{Jumlah spermatozoa} \times \text{pengenceran}}{\text{Jumlah kotak dihitung} \times \text{kedalaman ruang}}$$

Sebagian lagi dibuat preparat apus dengan pewarnaan Giemsa 3% untuk penghitungan spermatozoa dengan morfologis normal (%) berdasarkan rumus oleh Fatmawati dkk. (2016):

$$\frac{\text{Jumlah spermatozoa normal}}{\text{Jumlah spermatozoa terhitung}} \times 100$$

Preparat yang sama juga digunakan untuk penghitungan viabilitas spermatozoa (%) berdasarkan rumus oleh Hafaz *et al.* (2017):

$$\frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa terhitung}} \times 100$$

### Analisis data

Tanda-tanda ketoksikan, konsumsi makan dan minum, serta kondisi feses dicatat sebagai data kualitatif dan dibandingkan antara tiga kelompok. Data kuantitatif (berat badan, suhu badan, berat relatif/indeks organ, jumlah sel-sel spermatogenik, serta konsentrasi dan kualitas spermatozoa) ditabulasi dalam Microsoft®Excel® 2010 dan dianalisis secara statistik berdasarkan uji *one-way* ANOVA dan uji *post hoc* Duncan's ( $\alpha=0,05$ ) menggunakan IBM®SPSS® v.23.

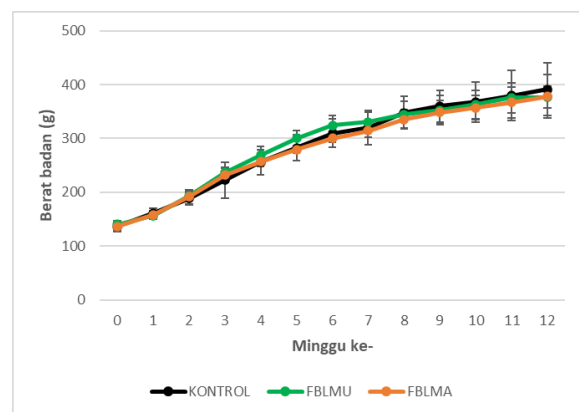
### Hasil dan Pembahasan

#### Tanda-tanda ketoksikan umum FBLMU dan FBLMA pada tikus Wistar jantan

Selama percobaan tidak ada satu pun tikus yang mati atau menunjukkan tanda-tanda sakit akibat mengkonsumsi filtrat buah luwangan meskipun durasi dan volume yang diberikan telah digandakan dari penelitian sebelumnya (Fitria dkk., 2019; Fitria dkk., 2020; Fitria dkk., 2021). Hal ini membuktikan bahwa zat-zat yang terkandung di dalam buah muda maupun matang tidak bersifat toksik terhadap fisiologis tikus Wistar jantan. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan setiap hari selama percobaan, sisa pakan dan air minum yang disediakan *ad libitum* tidak banyak bersisa. Hal ini berarti tikus tidak mengalami gangguan nafsu makan. Selain itu, kondisi feses normal dalam hal bentuk, warna,

maupun konsistensinya, yang mengindikasikan bahwa tidak ada kejadian diare.

Suatu bahan yang bersifat toksik pada umumnya menyebabkan gangguan fisiologis yang mengakibatkan hewan menolak makan sehingga kehilangan berat badan (Rakshit *et al.*, 2008; Kifayatullah *et al.*, 2015). Penurunan berat badan mulai terlihat setelah pemaparan jangka panjang atau selama 21 hari (EFSA, 2009), dan menjadi signifikan setelah 70 hari (Wang *et al.*, 2019). Tikus-tikus yang dicekok FBLMU atau FBLMA terus mengalami peningkatan berat badan seiring waktu secara normal sebagaimana Kontrol (**Gambar 2**). Hal ini membuktikan bahwa zat-zat yang terkandung di dalam kedua filtrat buah luwangan tersebut tidak toksik terhadap fisiologis tikus Wistar jantan.



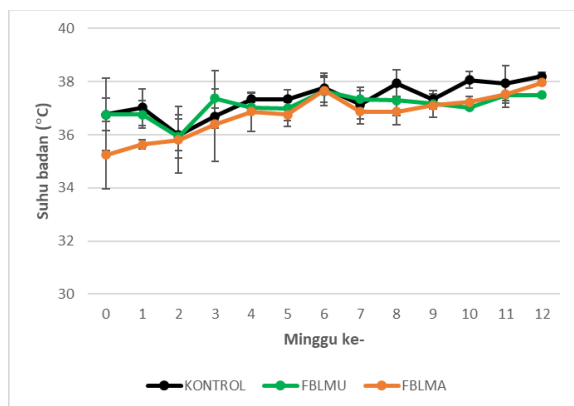
**Gambar 2.** Berat badan tikus Wistar jantan dengan pemberian *per oral* filtrat buah luwangan selama 77 hari.

Keterangan: **KONTROL**= air suling 2 mL/individu/hari,  
**FBLMU**= filtrat buah luwangan muda 2 mL/individu/hari,  
**FBLMA**= filtrat buah luwangan matang 2 mL/individu/hari

Suhu badan merupakan parameter dasar untuk pengamatan tanda-tanda ketoksikan. Termoregulasi pada rodensia sebagai bentuk tanggapan fisiologis terhadap racun yang masuk melalui makanan adalah dengan menurunkan suhu badan (hipotermia), dengan tujuan untuk memperlambat absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi racun, serta menurunkan toksisitas. Sebaliknya, peningkatan suhu badan (demam) terjadi karena mekanisme toksikologis lain seperti toksisitas otot atau respons imunologis (Watkinson *et al.*, 1989; Redfern *et al.*, 2017).

Menurut Fitria dkk. (2021), suhu badan normal tikus adalah 35.2–37.8 °C. Meskipun

suhu badan tikus dalam percobaan ini sedikit lebih tinggi daripada referensi, namun hasil pemeriksaan hematologis (tidak ditampilkan dalam artikel ini) tidak menunjukkan adanya peningkatan jumlah leukosit. Dengan kata lain tikus dalam kondisi sehat/normal, tidak terjadi inflamasi atau infeksi. Grafik suhu badan ketiga kelompok berhimpitan, mengindikasikan bahwa FBLMU dan FBLMA dapat ditolerir oleh tubuh, tidak dianggap sebagai zat toksik atau antigen yang harus direspons (**Gambar 3**).



**Gambar 3.** Suhu badan tikus Wistar jantan dengan pemberian *per oral* fitrat buah luwungan selama 77 hari.

Keterangan: **KONTROL**= air suling 2 mL/individu/hari, **FBLMU**= fitrat buah luwungan muda 2 mL/individu/hari, **FBLMA**= fitrat buah luwungan matang 2 mL/individu/hari

### Pengaruh pemberian FBLMU dan FBLMA terhadap spermatogenesis

Pemberian FBLMU berdampak positif terhadap spermatogenesis karena mampu meningkatkan jumlah spermatid dan indeks spermatogenesis, meskipun berdasarkan uji

statistik peningkatan ini tidak signifikan. Menurut Cao & Brown (2019), bahan-bahan alami yang berpotensi obat membutuhkan waktu hingga menunjukkan efek yang nyata. Oleh karena itu, perlu dilakukan percobaan dengan durasi yang lebih panjang untuk mengetahuinya. Sebaliknya, FBLMA justru berdampak negatif karena secara signifikan menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik (**Tabel 1**). Spermatogonia cenderung akan dipertahankan jumlahnya karena perannya sebagai sel punca (*stem cell*). Spermatisit yang tampak pada preparat pada umumnya adalah spermatisit primer. Spermatisit sekunder jarang terlihat karena dalam waktu singkat akan segera berdiferensiasi menjadi spermatid (Fitria dkk., 2015; Firwan *et al.*, 2020). Oleh karena itu, dalam kondisi normal jumlah spermatisit yang terhitung pada umumnya tidak jauh berbeda dari jumlah spermatogonia. Sementara itu jumlah spermatid adalah sekitar empat kalinya.

Secara teoritis, jumlah spermatid adalah 4× jumlah spermatisit atau 4× jumlah spermatogonium B. Dalam kenyataannya, tidak semua sel dapat berkembang. Secara alami terdapat mekanisme apoptosis dalam rangka efisiensi spermatogenesis (Tapia & Pena, 2009). Selain itu, obat-obatan dan zat-zat toksik lainnya juga dapat menyebabkan kegagalan proliferasi sel dalam spermatogenesis atau disebut sebagai *reprotoxic* (Semet *et al.*, 2017). Berdasarkan **Tabel 1**, jumlah spermatid hanya sekitar 3× jumlah spermatogonia atau spermatisit. FBLMU memiliki nilai tertinggi (3,52×), disusul Kontrol (3,25×) dan FBLMA (2,95×). Hal ini mengindikasikan bahwa FBLMU dapat meningkatkan spermatogenesis, sebaliknya FBLMA justru menurunkan spermatogenesis.

**Tabel 1.** Rerata jumlah sel spermatogenik per tubulus seminiferus dan indeks spermatogenesis tikus Wistar jantan dengan pemberian *per oral* fitrat buah luwungan selama 77 hari.

	KONTROL	FBLMU	FBLMA
Spermatogonia	54,07 ± 2,14 <sup>a</sup>	52,17 ± 4,24 <sup>a</sup>	<b>54,77 ± 4,54<sup>a</sup></b>
Spermatisit	<b>62,23 ± 4,58<sup>a</sup></b>	61,50 ± 5,20 <sup>ab</sup>	59,53 ± 2,76 <sup>b</sup>
Spermatid	188,27 ± 25,76 <sup>a</sup>	<b>199,27 ± 12,78<sup>a</sup></b>	168,93 ± 1,53 <sup>b</sup>
Indeks spermatogenesis	304,57 ± 61,43 <sup>a</sup>	<b>312,93 ± 67,25<sup>a</sup></b>	280,23 ± 53,50 <sup>b</sup>

Keterangan:

**KONTROL**= air suling 2 mL/individu/hari, **FBLMU**= fitrat buah luwungan muda 2 mL/individu/hari, **FBLMA**= fitrat buah luwungan matang 2 mL/individu/hari. Huruf yang sama di belakang angka/nilai pada lajur yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada uji statistik *one-way ANOVA* dan Duncan's ( $p > 0,05$ ). Angka/nilai yang dicetak **tebal** menunjukkan nilai tertinggi dari ketiga kelompok yang dibandingkan.

### Pengaruh pemberian FBLMU dan FBLMA terhadap spermatozoa

Pemberian FBLMU berdampak positif terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa karena mampu meningkatkan konsentrasi spermatozoa secara signifikan, hingga dua kali lipat dibandingkan Kontrol. FBLMU juga mampu meningkatkan persentase spermatozoa dengan morfologis normal dan viabilitasnya. Seperti halnya FBLMU, pemberian FBLMA juga mampu meningkatkan konsentrasi dan viabilitas spermatozoa, akan tetapi memiliki persentase spermatozoa dengan morfologis normal yang paling sedikit di antara ketiga kelompok (**Tabel 2**). Hasil sebelumnya menunjukkan bahwa FBLMA menurunkan efisiensi spermatogenesis. Selain mengganggu proses spermatogenesis, kami menduga bahwa di dalam FBLMA juga mengandung zat-zat yang

dapat merusak struktur morfologis spermatozoa (*reprotoxic*).

Spermatozoa merupakan produk akhir dari proses spermatogenesis, sehingga kuantitas dan kualitas spermatozoa berkorelasi dengan jumlah sel-sel spermatogenik yang tumbuh dan berkembang (Holstein *et al.*, 2003). Kelompok FBLMU memiliki indeks spermatogenesis yang lebih tinggi daripada kelompok FBLMA, sehingga memiliki konsentrasi spermatozoa yang lebih banyak. Indeks spermatogenesis pada Kontrol lebih tinggi daripada kelompok FBLMA tetapi konsentrasi spermatozoa sangat sedikit. Hal ini diduga karena FBLMU dan FBLMA mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berperan dalam meningkatkan efisiensi spermatogenesis, terutama pada fase spermiogenesis, yaitu proses metamorfosis dan maturasi spermatid menjadi spermatozoa (Khojasteh *et al.*, 2016; Noh *et al.*, 2020).

**Tabel 2.** Kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus Wistar jantan dengan pemberian *per oral* filtrat buah luwungan selama 77 hari.

	KONTROL	FBLMU	FBLMA
Konsentrasi spermatozoa ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	709,33 $\pm$ 152,64 <sup>a</sup>	<b>1481,33 <math>\pm</math> 401,49<sup>b</sup></b>	1456,67 $\pm$ 369,254 <sup>b</sup>
Morfologi normal (%)	57,33 $\pm$ 4,48 <sup>ab</sup>	<b>61,83 <math>\pm</math> 2,95<sup>a</sup></b>	43,00 $\pm$ 13,95 <sup>b</sup>
Viabilitas (%)	91,33 $\pm$ 3,40 <sup>a</sup>	96,50 $\pm$ 1,78 <sup>b</sup>	<b>98,00 <math>\pm</math> 0,41<sup>b</sup></b>

Keterangan:

**KONTROL**= air suling 2 mL/individu/hari, **FBLMU**= filtrat buah luwungan muda 2 mL/individu/hari, **FBLMA**= filtrat buah luwungan matang 2 mL/individu/hari. Huruf yang sama di belakang angka/nilai pada lajur yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada uji statistik *one-way* ANOVA dan Duncan's ( $p > 0,05$ ). Angka/nilai yang dicetak **tebal** menunjukkan nilai tertinggi dari ketiga kelompok yang dibandingkan.

### Pengaruh pemberian FBLMU dan FBLMA terhadap berat relatif (indeks) organ

Perlakuan *per oral* FBLMU dan FBLMA meningkatkan berat relatif/indeks organ-organ reproduksi yang berbeda, namun tidak signifikan dibandingkan Kontrol. FBLMU meningkatkan indeks testis dan epididimis, sementara FBLMA meningkatkan indeks vesikula seminalis dan prostat (**Tabel 3**). Testis dan epididimis merupakan tempat pembentukan dan pematangan spermatozoa, sehingga berat/massa testis berkorelasi positif dengan jumlah sel-sel spermatogenik dan berat/massa epididimis berkorelasi positif dengan konsentrasi spermatozoa. Dengan demikian, massa/berat testis juga berkorelasi positif dengan berat/massa

epididimis (Nwoha, 1995). Vesikula seminalis dan prostat merupakan kelenjar kelamin aksesoris utama yang berperan penting dalam nutrisi, proteksi, dan memfasilitasi transportasi spermatozoa dalam rangka proses fertilisasi oosit. Peningkatan berat/massa kedua kelenjar ini berkaitan dengan volume sekresi yang dihasilkan. Sekret prostat berupa cairan seperti susu encer yang bersifat alkali (pH 7,2-8,0), mengandung berbagai enzim proteolitik dan elektrolit. Sekret vesikula seminalis berkontribusi hingga 85% dari total volume semen, berupa cairan kental berwarna kekuningan yang bersifat alkali, mengandung fruktosa, berbagai protein, fibrinogen, asam askorbat, dan prostaglandin (Flint *et al.*, 2015).

Selain berat organ-organ reproduksi, kami juga membandingkan pertambahan berat badan selama percobaan dan massa lemak viseral. Kelompok yang diberi buah luwungan memiliki selisih berat badan awal dan akhir serta massa lemak viseral yang lebih rendah dibandingkan Kontrol namun tidak signifikan (**Tabel 3**). Hasil pengamatan tidak menunjukkan adanya penurunan konsumsi makan-minum dan juga tidak ada kejadian diare, sehingga selisih berat

badan tersebut bukanlah efek negatif buah luwungan. Justru sebaliknya, kami menduga buah luwungan mengandung senyawa bioaktif yang berperan dalam menekan berat badan dan deposisi lemak viseral. Penumpukan jaringan lemak (adiposa) merupakan indikasi dari obesitas (Woon *et al.*, 2014). Berdasarkan temuan ini, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi buah luwungan sebagai agen antiobesitas alami.

**Tabel 3.** Berat badan, massa lemak viseral, dan berat relatif (indeks) organ-organ reproduksi tikus Wistar jantan dengan pemberian *per oral* filtrat buah luwungan selama 77 hari.

	KONTROL	FBLMU	FBLMA
Selisih berat badan awal dan akhir (g)	<b>254,33 ± 39,85<sup>a</sup></b>	235,67 ± 20,67 <sup>a</sup>	242,00 ± 44,50 <sup>a</sup>
Massa lemak viseral (g)	<b>6,52 ± 1,67<sup>a</sup></b>	5,67 ± 1,31 <sup>a</sup>	5,64 ± 0,05 <sup>a</sup>
Indeks testis (%)	0,74 ± 0,03 <sup>a</sup>	<b>0,79 ± 0,08<sup>a</sup></b>	0,78 ± 0,05 <sup>a</sup>
Indeks epididimis (%)	0,34 ± 0,06 <sup>a</sup>	<b>0,37 ± 0,01<sup>a</sup></b>	0,34 ± 0,03 <sup>a</sup>
Indeks vesikula seminalis (%)	0,35 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,05 <sup>a</sup>	<b>0,36 ± 0,06<sup>a</sup></b>
Indeks kelenjar prostat	0,16 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	<b>0,17 ± 0,02<sup>a</sup></b>

Keterangan:

**KONTROL**= air suling 2 mL/individu/hari, **FBLMU**= filtrat buah luwungan muda 2 mL/individu/hari, **FBLMA**= filtrat buah luwungan matang 2 mL/individu/hari. Huruf yang sama di belakang angka/nilai pada lajur yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada uji statistik *one-way* ANOVA dan Duncan's ( $p > 0,05$ ). Angka/nilai yang dicetak **tebal** menunjukkan nilai tertinggi dari ketiga kelompok yang dibandingkan.

Berbeda dari kajian toksisitas umum yang bertujuan mendapatkan informasi ketoksikan dan keamanan suatu agen terhadap kondisi fisiologis atau kesehatan secara keseluruhan, toksisitas reproduktif menekankan pada efek suatu agen terhadap sistem reproduksi. Untuk informasi yang komprehensif, OECD menerbitkan *Test Guideline* No. 422 yang merupakan gabungan dari uji toksisitas umum dan uji toksisitas reproduktif (OECD, 2015).

Prosedur penelitian ini mengacu pada OECD *Test Guideline* No. 421 yang khusus dirancang untuk menyediakan informasi terkait efek suatu bahan kimia terhadap profil reproduksi jantan dan betina (OECD, 2016). Dalam pelaksanaannya, kami memodifikasi beberapa aspek, yaitu: jumlah hewan coba, dosis/konsentrasi bahan uji, dan durasi percobaan, tanpa mengubah prinsip dan tujuan. Hal ini tidak menyalahi prosedur karena di dalam panduan tersebut terdapat pasal *Limit Test* yang memberi keleluasaan bagi peneliti untuk merancang percobaannya berdasarkan hasil-hasil riset yang telah dilakukan sebelumnya. Selain

itu, dalam penelitian ini kami membatasi parameter hanya pada fungsi gonad dan kelenjar-kelenjar kelamin aksesoris saja. Parameter lain berupa uji fertilitas yang meliputi perilaku kawin, konsepsi, dan kondisi anakan belum kami lakukan. Menurut OECD (2016), pengamatan spermatogenesis dan analisis spermatozoa sudah cukup untuk mendeteksi ada tidaknya efek toksik suatu bahan terhadap fertilitas individu jantan.

Kajian toksisitas umum pemberian *per oral* FBLMU dan FBLMA telah dilakukan, untuk periode akut (14 hari) menggunakan tikus Wistar betina (Fitria dkk., 2019), untuk periode subakut (28 hari) menggunakan tikus betina (Fitria dkk., 2020) dan tikus jantan (Fitria dkk., 2021) dengan parameter berat badan, suhu badan, konsumsi makan dan minum, hematologi, biokimia klinis, dan nekropsi. Sica (2017), Christianty (2017), dan Stevani (2017) melanjutkan kajian toksisitas oral FBLMU dan FBLMA untuk periode subkronik (90 hari). Semua hasil menunjukkan bahwa konsumsi FBLMU dan FBLMA dengan volume 1 mL/individu (kisaran berat badan 120-150 g)

relatif aman (NOAEL).

Berdasarkan hasil tersebut, pada penelitian ini kami menambah volume cekok menjadi 2 mL/individu. Menurut NRC (2011), volume cekok untuk tikus tidak boleh melebihi 1 mL/100 g bb. Namun demikian, pengekokan 2 mL/100 g bb diperkenankan untuk larutan akuosa (OECD, 2016), seperti halnya FBLMU dan FBLMA.

Buah luwangan diberikan kepada hewan coba dalam bentuk filtrat segar (bukan ekstrak) yang dibuat langsung sesaat sebelum diberikan, dengan pertimbangan akan diterapkan sebagai buah yang langsung dikonsumsi sehari-hari (Fitria dkk., 2019; Fitria dkk., 2020; Fitria dkk., 2021). Hal ini mengacu pada kajian etnobotani oleh Ali & Chaudary (2011) yang menyatakan bahwa buah luwangan lazim dikonsumsi secara langsung terutama oleh masyarakat Asia Barat. Selain itu, buah luwangan juga dikonsumsi oleh ternak (Kunwar & Bussmann, 2006) dan hewan-hewan frugivora liar yang meliputi berbagai jenis ikan, reptil, burung, hingga mammalia, termasuk rodensia dan primata (Shanahan *et al.*, 2001).

Berdasarkan penelusuran literatur, kami mendapatkan beberapa spesies *Ficus* yang memiliki efek positif terhadap sistem reproduksi jantan. Sebagai contoh *F. sycomorus* dapat meningkatkan konsentrasi spermatozoa serta pH dalam testis dan epididimis (Igbokwe *et al.*, 2009). *F. deltoidea* dapat meningkatkan kadar testosteron, konsentrasi spermatozoa dan motilitasnya (Samsulrizal *et al.*, 2012). *F. asperifolia* dapat meningkatkan berat badan, indeks testis, epididimis, vas deferens, prostat dan vesikula seminalis (Watcho *et al.*, 2017).

Di sisi lain, terdapat beberapa spesies *Ficus* yang justru berdampak negatif terhadap sistem reproduksi jantan karena memiliki aktivitas antifertilitas. Sebagai contoh *F. racemosa* dapat menurunkan konsentrasi, motilitas, viabilitas, dan morfologi normal spermatozoa, indeks kelenjar-kelenjar reproduksi, terutama epididimis dan vesikula seminalis (Ahrwar *et al.*, 2011). *F. thonningii* dapat menyebabkan degenerasi testis, merusak struktur integritas sel-sel spermatogenik (Adewole & Attah, 2019). *F. sycomorus* dapat merusak asosiasi epitelium germinativum sehingga menurunkan berat testis, epididimis, konsentrasi, motilitas, dan morfologis normal spermatozoa (Sakpa & Wilson, 2019).

Spermatogenesis adalah proses yang tidak efisien karena tidak semua sel-sel spermatogenik dapat tumbuh, berproliferasi, dan berdiferensiasi menjadi spermatozoa yang fungsional (Holstein *et al.*, 2003). Spermatogenesis diatur oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Metabolit sekunder tumbuhan adalah salah satu agen kimiawi eksogen yang dapat mempengaruhi efisiensi spermatogenesis. Antioksidan atau *reactive oxygen species* (ROS) *inhibitor* berperan penting dalam menjaga kesehatan sel-sel spermatogenik sehingga dapat tumbuh dan berkembang dengan baik (Jung *et al.*, 2017; Noh *et al.*, 2020).

Hasil skrining fitokimia buah luwangan menunjukkan kandungan alkaloid, steroid, fenol, flavonoid, pektin, glikosida, saponin, tanin, dan terpenoid (Lansky & Paavilainen, 2011; Layina, 2018; Nastiti, 2018; Santika, 2018). Senyawa-senyawa tersebut adalah komponen bioaktif yang esensial dalam pemeliharaan spermatogenesis dan spermatozoa (Khojasteh *et al.*, 2016). Meskipun mengandung senyawa bioaktif yang sama, namun kadarnya berbeda pada buah luwangan yang muda dan yang matang. FBLMU mengandung lebih banyak alkaloid, tanin, fenol, saponin, dan flavonoid dibandingkan FBLMA. Sebaliknya, FBLMA mengandung steroid yang lebih tinggi daripada FBLMU (Layina, 2018; Nastiti, 2018; Santika, 2018), sehingga memberikan efek yang berbeda pada suatu sistem biologis yang sama, dalam hal ini adalah sistem reproduksi jantan. Menurut Daud *et al.* (2021), alkaloid, tanin, fenol, saponin, dan flavonoid dapat memperbaiki sistem reproduksi jantan dengan cara meningkatkan kadar testosteron dan kualitas spermatozoa. Sementara itu fitosterol bersifat sebaliknya, yaitu menurunkan kadar testosteron sehingga mengganggu efisiensi spermatogenesis dan produksi spermatozoa (Kopylov *et al.*, 2021). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini bahwa FBLMU memiliki efek positif terhadap sistem reproduksi jantan, sedangkan FBLMA memiliki efek negatif (*reprotoxic*).

Kami tertarik dengan temuan mengenai potensi antiobesitas buah luwangan karena peningkatan berat badan pada individu jantan/pria berdampak pada penurunan kadar testosteron, kualitas spermatozoa, dan infertilitas dibandingkan individu dengan berat normal/ideal (Katib, 2015). Berdasarkan studi pustaka kami mendapat informasi bahwa beberapa spesies



*Ficus* juga memiliki aktivitas antiobesitas. Sebagai contoh *F. carica* dapat menurunkan berat badan serta massa lemak peritoneal dan epididimal (Noordam dkk., 2019). Kajian fitokimia oleh Nasution & Mustanir (2016) menunjukkan kandungan terpenoid dan steroid dalam oleh *F. racemosa* yang berperan dalam mekanisme antiobesitas. *F. deltoidea* memiliki aktivitas antiobesitas melalui jalur antiadipogenik. Kandungan fenolik dan flavonoid menghambat maturasi preadiposit menjadi adiposit yang merupakan tahap awal terjadinya deposisi lemak visceral (Woon *et al.*, 2014). *F. hispida* juga memiliki semua senyawa bioaktif yang berperan sebagai antiobesitas tersebut (Lansky & Paavilainen, 2011; Layina, 2018; Nastiti, 2018; Santika, 2018).

## Kesimpulan

Perlakuan *per oral* filtrat buah luwangan muda meningkatkan jumlah spermatid, indeks spermatogenesis, konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa dengan morfologis normal serta viabilitasnya, serta berat relatif testis dan epididimis. Sementara itu, filtrat buah luwangan matang meningkatkan jumlah spermatogonia, konsentrasi spermatozoa, persentase viabilitas spermatozoa, serta berat relatif vesikula seminalis dan, namun menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik dan persentase spermatozoa dengan morfologis normal. Dapat disimpulkan bahwa konsumsi buah luwangan muda relatif aman bagi sistem reproduksi jantan dengan model tikus Wistar, sedangkan konsumsi buah luwangan matang secara terus menerus dalam jangka panjang perlu diwaspadai.

Meskipun tidak signifikan, filtrat buah luwangan muda dan matang dapat menekan pertambahan berat badan dan mengurangi timbunan lemak visceral sehingga berpotensi sebagai antiobesitas alami. Penanganan obesitas pada individu jantan/pria sangat penting karena juga berperan untuk memperbaiki kinerja sistem reproduksi yang menurun akibat kelebihan berat badan.

Kami berharap hasil penelitian ini dapat menambah wawasan masyarakat ilmiah di Indonesia dalam rangka eksplorasi potensi buah luwangan sebagai bahan pangan fungsional (nutrasetika) maupun obat herbal (farmasetika),

mengingat bahwa hingga kini buah luwangan belum banyak dimanfaatkan dan dibiarkan begitu saja hingga membusuk dan jatuh berguguran.

## Kontribusi Penulis

LF, LH, dan LNN bersama-sama merancang percobaan. LH dan LNN melakukan percobaan dan mengumpulkan data. LF, LH, dan LNN melakukan analisis data dan interpretasi hasil. LF menulis manuskrip dan mendapatkan masukan dari LH dan LNN.

## Ucapan terima kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kepala dan Staf Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi UGM yang telah memberi izin dan fasilitas selama penelitian. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada “Tim Ficus UAJY” (Angevia Merici Purnama Sica, Theresia Destri Ria Christianty, dan Elsa Rian Stevani S.) yang telah memberi inspirasi untuk penelitian ini.

## Konflik kepentingan

Tidak ada potensi konflik kepentingan yang dilaporkan oleh penulis.

## Referensi

- Adewole, K.E. & Attah, A.F. (2019). Antimalarial Plants with Potential Male-Factor Antifertility Properties. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 17(2), 20180214. <https://doi.org/10.1515/jcim-2018-0214>
- Ali, M. & Chaudary, N. (2011). *Ficus hispida* Linn.: A Review of Its Pharmacognostic and Ethnomedicinal Properties. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9): 96-102. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79104>
- Ahmadina, H., Ghanbari, M., Moradi, M.R. & Khaje-Dalouee, M. (2007). Effect of Cigarette Smoke on Spermatogenesis in Rats. *Urology Journal*, 4(3): 159-163. <https://doi.org/10.22037/uj.v4i3.121>
- Ahirwar, D., Ahirwar, B. & Kharya, M.D. (2011). Reversible Antifertility Activity of Hydroalcoholic Extract of *Ficus racemosa* L. in Male Mice. *Journal of*

- Reproduction and Contraception*, 22(1): 37-44. [https://doi.org/10.1016/S1001-7844\(12\)60005-4](https://doi.org/10.1016/S1001-7844(12)60005-4)
- API. (2010). Educational Commentary – Current Methods to Determine Sperm Counts. American Proficiency Institute. Traverse City, Lansing, MI. [http://www.api-pt.com/reference/commentary/2010cmi\\_croscopy.pdf](http://www.api-pt.com/reference/commentary/2010cmi_croscopy.pdf)
- Backer, C.A. & van den Brink, R.C.B. (1965). Flora of Java (Spermatophytes only). Volume 2, Angiospermae, Families 111-160. N.V.P. Noordhoff. Groningen.
- Bafor, E.E. & Igbinuwen, O. (2009). Acute Toxicity Studies of the Leaf Extract of *Ficus exasperata* on Haematological Parameters, Body Weight and Body Temperature. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(2): 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.001>
- Bakar, U.A., Subramaniam, P., Bashah, N.A.K., Kamalrudin, A., Kamaruzaman, K.A., Jasamai, M., Aizat, W.M., Shahinuzzaman, M. & Noor, M.M. (2020). Sperm Proteomics Analysis of Diabetic Induced Male Rats as Influenced by *Ficus carica* Leaf Extract. *Processes*, 8, 395. <https://doi.org/10.3390/pr8040395>
- Cao, C. & Brown, B. (2019). Understanding Chinese Medicine and Western Medicine to Reach the Maximum Treatment Benefit. *Journal of Translational Science*, 5: 1-2. <https://doi.org/10.15761/JTS.1000334>
- Chaudary, L.B., Sudhakar, J.V., Kumar, A., Bajpai, O., Tiwari, R., & Murthy, V.S. (2012). Synopsis of the Genus *Ficus* L. (Moraceae) in India. *Taiwania*, 57(2): 193-216. [https://doi.org/10.6165/tai.2012.57\(2\).193](https://doi.org/10.6165/tai.2012.57(2).193)
- Christianty, T.D.R. (2017). *Profil Hematologis Tikus Putih (Rattus norvegicus Berkenhout, 1969) Galur Wistar pada Uji Toksisitas Oral Subkronis Filtrat Buah Luwungan (Ficus hispida L.f.)*. Skripsi. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta (UAJY). Yogyakarta.
- Daud, D., Dewa, M.S.A.M., Mahbob, E.N.M. & Razak, W.R.W.A. (2021). Short Communication: Phytochemical diversity and bioactivity of Malaysian *Premna cordifolia* (Lamiaceae). *Biodiversitas*, 22(6): 3245-3248. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220628>
- EFSA. (2009). Guidance Document on Risk Assessment for Birds and Mammals on Request from EFSA. *European Food Safety Authority Journal*, 7, 1438. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1438>
- Fatmawati, D., Isradji, I., Yusuf, I. & Suparmi. (2016). Kualitas Spermatozoa Mencit Balb/C Jantan Setelah Pemberian Ekstrak Buah Kepel (*Stelechocarpus burahol*). *Majalah Kedokteran Bandung*, 48(3): 155-159. <https://doi.org/10.15395/mkb.v48n3.845>
- Flint, M., McAlister, D.A., Agarwal, A. & du Plessis, S.S. (2015). Male Accessory Sex Glands: Structure and Function. In: Singh, S.K. (Ed). (2015). *Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology*. 1st Edition. CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN 9780429068829. pp. 246-258. <https://doi.org/10.1201/b18900>
- Firwan, N.N.Z., Akmal, M., Masyitha, D., Salim, M.N., Jalaluddin, M. & Siregar, T.N. (2020). Histology and Histomorphometry of Testes in Turkeys (*Meleagris gallopavo*) Based on Age Level. *Proceedings of the 2nd International Conference on Veterinary, Animal, and Environmental Sciences (ICVAES 2020)*. *Advances in Biological Sciences Research*, 12: 215-220. Atlantis Press B.V. <https://doi.org/10.2991/absr.k.210420.046>
- Fitria, L., Mulyati, Tiraya, C.M. & Budi, A.S. (2015). Profil Reproduksi Jantan Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Stadia Muda, Pradewasa, dan Dewasa. *Jurnal Biologi Papua*, 7(1): 29-36. <https://doi.org/10.31957/jbp.429>
- Fitria, L., Suranto, R.D.P. & Utami, I.D. (2019). Uji Toksisitas Oral Akut *Single Dose* Filtrat Buah Luwungan (*Ficus hispida* L.f.) pada Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar. *Jurnal*

- Mangifera Edu*, 4(1): 1-18.  
<https://doi.org/10.31943/mangiferaedu.v4i1.39>
- Fitria, L., Suranto, R.D.P., Utami, I.D. & Puspitasari, S.A. (2020). Uji Toksisitas Oral Repeated Dose Filtrat Buah Luwangan (*Ficus hispida* L.f.) Menggunakan Model Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar. *Berita Biologi*, 19(3A): 289-300.  
<https://doi.org/10.14203/beritabiologi.v19i3A.3936>
- Fitria, L., Na'ilah, L.N. & Handayani, L. (2021). Toksisitas Oral Subakut Filtrat Buah Luwangan (*Ficus hispida* L.f.) pada Tikus Riul [*Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)] Wistar Jantan. *Jurnal Biologi Indonesia*, 17(1): 81-91.  
<https://doi.org/10.47349/jbi/17012021/81>
- Fitria, L., Gunawan, I.C.P., Sanjaya, W.B.T. & Meidianing, M.I. (2022). Single-Dose Acute Oral Toxicity Study of Chloroform Extract of Snake Plant (*Sansevieria trifasciata* Prain.) Leaf in Wistar Rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 7(1): jtbb69389.  
<https://doi.org/10.22146/jtbb.69389>
- Freitas, F.E.L., Cordeiro-Mori, F., Sasso-Cerri, E., Lucas, S.R.R. & Miraglia, S.M. (2002). Alterations of Spermatogenesis in Etoposide-Treated Rats: A Stereological Study. *Interciencia*, 27(5): 227-235.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442002000500003&lng=en&tlng=en](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442002000500003&lng=en&tlng=en)
- Gupta, P.C. (2012). A Preliminary Study on Effects of Leaf Extract of *Ficus bengalensis* (Linn.) on Spermatogenesis and Fertility in Albino Mice. *International Journal of PharmTech Research*, 4(1): 226-232.  
[https://sphinxsai.com/2012/pharm/PHARM/PT=34\(226-232\)JM12.pdf](https://sphinxsai.com/2012/pharm/PHARM/PT=34(226-232)JM12.pdf)
- Hafaz, N.A., Brahmadi, A. & Putri, P.M. (2017). The Effect of Fasting to the Quality of Spermatozoa in Adult Male *Rattus norvegicus*. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 8(2): 87-95.  
<https://doi.org/10.20885/JKKI.Vol8.Iss2.art3>
- Holstein, A.F., Schulze, W. & Davidoff, M. (2003). Understanding Spermatogenesis is A Prerequisite for Treatment. *BMC Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 107.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-107>
- IACUC IOWA. (2020). Vertebrate Animal Research: Anesthesia (Guideline). <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>
- Igbokwe, N.A., Sandabe, U.K., Sanni, S., Wampana, B., Wiam, I.M. & Igbokwe, I.O. (2009). Aqueous Stem-Bark Extract of *Ficus sycomorus* Increases Sperm Production and pH of Sperm Microenvironment in Growing Albino Rat. *Animal Reproduction*, 6(4): 509-515.  
<https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6072f7783717068b477f>
- Jung, S.E., Kim, Y.H., Cho, S.H., Kim, B.J., Lee H.S., Hwang, S.S., Kim, G.B., Kim, Y.H., Pang, M.G., Lee, S.Y. & Ryu, B.Y. (2017). A Phytochemical Approach to Promotion of Self-renewal in Murine Spermatogonial Stem Cell by Using *Sedum sarmentosum* Extract. *Scientific Reports*, 7, 11441.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11790-0>
- Katib A. (2015). Mechanisms Linking Obesity to Male Infertility. *Central European Journal of Urology*, 68(1): 79-85.  
<https://doi.org/10.5173/cej.2015.01.435>
- Kifayatullah, M., Mustafa, M.S., Sengupta, P., Sarker, M.M.R., Das, A. & Das, S.K. (2015). Evaluation of the Acute and Sub-Acute Toxicity of the Ethanolic Extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c Mice. *Journal of Acute Disease*, 4(4): 309-315.  
<https://doi.org/10.1016/j.joad.2015.06.010>
- Khojasteh, S.M.B., Khameneh, R.J., Houresfsnd, M. & Yaldagard, E. (2016). A Review on Medicinal Plants Used for Improvement of Spermatogenesis. *Biology and Medicine (Aligarh)*, 8(4): 292.

- <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000292>
- Kopylov, A.T., Malsagova, K.A., Stepanov, A.A. & Kaysheva, A.L. (2021). Diversity of Plant Sterols Metabolism: The Impact on Human Health, Sport, and Accumulation of Contaminating Sterols. *Nutrients*, 13, 1623. <https://doi.org/10.3390/nu13051623>
- Kunwar, R.M. & Bussmann, R.W. (2006). *Ficus* (Fig) Species in Nepal: A Review of Diversity and Indigenous Uses. *Lyonia*, 11(1): 85-97. [https://www.lyonia.org/articles/rbussmann/article\\_479/pdf/articleBody.pdf](https://www.lyonia.org/articles/rbussmann/article_479/pdf/articleBody.pdf)
- Lansky, E.P. & Paavilainen, H.M. (2011). Figs: The Genus *Ficus*: Traditional Herbal Medicines for Modern Times. CRC Press/Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton, FL. ISBN: 978-1-4200-8966-0. <https://doi.org/10.1201/9781420089677>
- Layina, Z. (2018). *Kandungan Metabolit Sekunder Fenol dan Steroid Buah Ficus hispida L.f. pada Tingkat Kematangan yang Berbeda*. Laporan Seminar. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Mawa, S., Husain, K. & Jantan, K. (2013). *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 13, 974256. <https://doi.org/10.1155/2013/974256>
- Nastiti, P. (2018). *Kandungan Total Alkaloid dan Tanin Buah Ficus hispida L.f. pada Tingkat Kematangan yang Berbeda*. Laporan Seminar. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Nasution, R. & Mustanir. 2016. Uji Antiobesitas dari Tumbuhan Famili Moraceae: *Ficus racemosa* dan *Morus alba*. Poster Penelitian Hibah Bersaing Desentralisasi dan Kompetitif Nasional (PPT/Produk Terapan). Universitas Syah Kuala, Banda Aceh. <https://rp2u.unsyiah.ac.id/index.php/welcome/prosesDownload/216/9>
- Noh, S., Go, A., Kim, D.B., Park, M., Jeon H.W. & Kim, B. (2020). Role of Antioxidant Natural Products in Management of Infertility: A Review of Their Medicinal Potential. *Antioxidants*, 9, 957. <https://doi.org/10.3390/antiox9100957>
- Noordam, E.R., Tamat, S.R. & Abdillah, S. (2019). Aktivitas Anti Obesitas Ekstrak Daun Tin (*Ficus carica* Linn) pada Tikus yang Diberi Diet Lemak Tinggi. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(1): 81-86. <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/700/484>
- NRC. (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th Ed. National Research Council. The National Academies Press. Washington, DC. ISBN: 978-0-309-18663-6 <https://doi.org/10.17226/12910>
- Nwoha, P.U. (1995). A comparative Study of the Correlation of Weights of the Body, Testis, and Epididymis in the Goat, Ram, Bat and Rat. *Kaibogaku Zasshi*, 70(4): 307-312. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8540278/>
- OECD. (2015). Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264242715-en>
- OECD. (2016). Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264380-en>
- Opuwari, C. & Monsees, T. (2020). Green Tea Consumption Increases Sperm Concentration and Viability in Male Rats and is Safe for Reproductive, Liver and Kidney Health. *Scientific Reports*, 10, 15269 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72319-6>
- Rakshit, K.D., Joladarashi, D., Raj, K.R. Narasimhamurthy, K., Saibaba, P. & Bhagya, S. (2008). Toxicity Studies of

- Detoxified *Jatropha* Meal (*Jatropha curcas*) in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3621-3625. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.010>
- Redfern, W.S., Tse, K., Grant, C., Keerie, A., Simpson, D.J., Pedersen, J.C., Rimmer, V., Leslie, L., Klein, S.K., Karp, N.A., Silito, R., Chartsias, A., Lukins, T., Heward, J., Vickers, C., Chapman, K. & Armstrong, J.D. (2017). Automated Recording of Home Cage Activity and Temperature of Individual Rats Housed in Social Groups: The Rodent Big Brother Project. *PLoS ONE*, 12(9): e0181068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181068>
- Sakpa, C.L. & Wilson, O.O. (2019). Anti-Spermatogenic Effects of *Ficus sycomorus* Aqueous Leaf Extract on Testes and Epididymis of Adult Male Wistar Rats. *African Scientist*, 20(1): 1-6. <http://www.ojs.klobexjournals.com/index.php/afs/article/view/387/445>
- Samsulrizal, S., Idzham, M., Zarin, A., Awang, Z. & Najib, M.L.H.M. (2012). Effect of *Ficus deltoidea* Leaves Extracts on Blood Clotting, Sperm Quality and Testosterone Level in Alloxan-Induced Male Diabetic Rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 13(1): 111-114. <https://doi.org/10.1109/CHUSER.2011.6163864>
- Santika, R.F. (2018). *Metabolit Sekunder Flavonoid dan Steroid pada Buah Ficus hispida* L.f. pada Tingkat Kematangan yang Berbeda. Laporan Seminar. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Semet, M., Paci, M., Saias-Magnan, J., Metzler-Guillemain, C., Boissier, R., Lejeune, H. & Perrin, J. (2017). The Impact of Drugs on Male Fertility: A Review. *Andrology*, 5(4): 640-663 <https://doi.org/10.1111/andr.12366>
- Sica, A.M.P. (2017). Uji Fungsi Ginjal dan Hati Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1969) Galur Wistar pada Uji Toksisitas Oral Subkronis Filtrat Buah Luwungan (*Ficus hispida* L.f.). Skripsi. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta (UAJY). Yogyakarta.
- Shanahan, M., So, S., Compton, S.G. & Corlett, R. (2001). Fig-Eating by Vertebrate Frugivores: A Global Review. *Biological Reviews*, 76(4): 529-572. <https://doi.org/10.1017/S1464793101005760>
- Shubina, O.S. & Dudenkova, N.A. (2016). The Effect of Lead on the Process of Spermatogenesis in Sex Glands of Male Albino Rats. *Veterinary World*, 9(10): 1129-1134. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1129-1134>
- Stevani, E.R. (2017). *Profil Lipid Tikus Putih (Rattus norvegicus* Berkenhout, 1969) Galur Wistar pada Uji Toksisitas Oral Subkronis Filtrat Buah Luwungan (*Ficus hispida* L.f.). Skripsi. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta (UAJY). Yogyakarta.
- Tapia, J.A. & Pena, F.J. (2009). Apoptotic Events in Male Germ Cells and in Mature Mammalian Spermatozoa. In: Salido, G.M. & Rosado, J.A. (eds.). *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9873-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9873-4_8)
- Wang, M., Guckland, A., Murfitt, R., Ebeling, M., Sprenger, D., Foudoulakis, M. & Koutsaftis, A. (2019). Relationship Between Magnitude of Body Weight Effects and Exposure Duration in Mammalian Toxicology Studies and Implications for Ecotoxicological Risk Assessment. *Environmental Sciences Europe*, 31, 38. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0221-1>
- Watcho, P., Watio, H.M., Wankeu-Nya, M., Ngadjui, E., Defo, P.D., Nkeng-Efouet, P.A., Nguelefack, T.B. & Kamanyi, A. (2017). Androgenic Effects of Aqueous and Methanolic Extracts of *Ficus asperifolia* in Male Wistar Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 42.

- <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1547-5>
- Watkinson, W.P., Highfill, J.W. & Gordon, C.J. (1989). Modulating Effect of Body Temperature on the Toxic Response Produced by the Pesticide Chlordimeform in Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 28(4): 483-500. <https://doi.org/10.1080/15287398909531366>
- Wira, D.W., Mardawati, E., Djali, M. & Balia, R.L. (2020). The Characterization of *Ficus lyrata* Warb Fruit Extract and the Effect on Toxicity, Physicochemical, and Microbiology Properties of Chicken Carcass. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 10(1): 362-367. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.10.1.9770>
- Woon, S.M., Seng, Y.W., Ling, A.P.K., Chye, S.M. & Koh, R.Y. (2014). Anti-Adipogenic Effects of Extracts of *Ficus deltoidea* var. *deltoidea* and var. *angustifolia* on 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 15(3): 295-302. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1300123>