

# PENGARUH ANTIMITOSIS EKSTRAK *Achyranthes Aspera* Linn PADA PEMBELAHAN SEL EMBRIO (CLEAVAGE)

Wurlina\*

Bagian Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga - Surabaya

## ABSTRACT

To study the antimitotic effect of an extract of the leaf *Achyranthes aspera* Linn on embryonal cleavage rats (*Rattus norvegicus*). Rats ova were fertilized in vitro, and the suitable zygote and embryo were selected to use as samples, which were divided into 5 groups. Each group comprised 80 ova/embryo. Those groups were: group 1. ova for fertilization, group 2. zygote, group 3. 2 cell embryo, group 4. 4 cell embryo and group 5. 8 cell embryo. Each group was divided into 4 treatments, each of which consisted of 20 ova/embryos. The treatments were as follows: control treatment receiving TCM 199 media, and treatment 1, 2 and 3 receiving *Achyranthes aspera* Linn alkaloid of 20, 30, and 40 ppm respectively. Observation to embryonal cleavage and development was out 12 and 24 hours after treatment. Concluded from the results that the administration of *Achyranthes aspera* Linn as much as 30 ppm in vitro could 1) inhibits fertilization zygote and 2, 4, and 8 cell embryonal cleavage, growth and development 2) induced zygote and embryonal membrane recruitment and blastomere degeneration and 3) inhibits zygote and embryonal mitotic cleavage at metaphase stage.

**Key words:** *Achyranthes aspera* Linn, antimitotic, embryo

## PENGANTAR

Tanaman *Achyranthes aspera* Linn yang dikenal dengan nama jarong, jarongan, atau remek getih diketahui mempunyai efek antifertilitas pada mencit (Wurlina 2000, Wurlina, dan Sastrowardoyo, 2002). Tanaman ini telah digunakan secara empirik oleh masyarakat di pedesaan untuk menjarangkan kelahiran yang diminum pasca melakukan hubungan seksual dan wanita hamil dilarang minum karena dapat menyebabkan keguguran (Mardiswoyo dan Kusuma, 1968).

Berdasarkan atas kandungan bahan yang terdapat pada tanaman *Achyranthes aspera* Linn diketahui mengandung saponin, alkaloid, betain, akirantin, ramnose, glukose, galaktose (Mardiswoyo dan Kusuma, 1968). DepKes (1997) menyebutkan daun *achyranthes aspera* Linn mengandung saponin, flavonoid dalam bentuk polifenol dan alkaloid. Wei dkk. (1997) menemukan senyawa flavonoid yang terdapat dalam *Achyranthes aspera* Linn adalah  $\alpha$  spinasterol,  $\beta$  sitosterol, *crysophanol*, *dibutyl phthalate*, asam palmitat,  $\alpha$ -spinasterol-3- $\beta$ -D glikosida, *daukosterol* dan *ecdysteron*. Ida dkk. (1998) menemukan senyawa alkaloid pada akar *Achiranthos aspera* Linn dalam bentuk glikosida triterpenoid dan *achiranthoside* E & F. Gao dkk. (2000) menemukan flavonoid *ecdysteron* dan alkaloid betain serta Chakraborty dkk. (2002) menemukan senyawa alkaloid, non alkaloid dan saponin pada ekstrak metanol.

Triterpenoid dan saponin tanaman berpengaruh terhadap permeabilitas membran sel. Peningkatan permeabilitas membran sel dapat menyebabkan cairan elektrolit di luar sel akan mudah masuk ke dalam sel,

akibatnya sel akan membengkak dan mudah pecah, di samping itu berperan sebagai transportasi nutrisi yang diperlukan untuk metabolisme sel dalam menghasilkan energi. Permeabilitas membran sel telur dan embrio berhubungan erat dengan proses pertumbuhan dan perkembangan embrio (*cleavage*) yaitu dapat menyebabkan pengkerutan membran sehingga integritas membran akan menurun (Geisert dkk., 1997, Mitaine dkk., 2001).

Cody dkk. (1997) dan Gomez dkk. (2001) menyatakan bahwa flavonoid tanaman dapat menghambat sekresi gonadotropin yang menyebabkan hambatan pada pertumbuhan folikel dan proses ovulasi. Nigg dan Seigler (1992) menyatakan bahwa alkaloid maupun flavonoid yang berasal dari tanaman, dapat menghalangi bertemunya spermatozoa dan sel telur. Wurlina (2000) menyatakan perasan daun *Achyranthes aspera* Linn dapat menyebabkan perubahan siklus birahi mencit yaitu terjadi perpanjangan fase proestrus dan diestrus. Wurlina dan Sastrowardoyo (2002) menyatakan ekstrak daun *Achyranthes aspera* Linn dapat menyebabkan penurunan jumlah korpus luteum, tapak implantasi dan jumlah fetus pada tikus. Wurlina dkk. (2003) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun *Achyranthes aspera* Linn menghambat pembelahan dan perkembangan embrio tikus secara *in vivo* pada dosis 300 mg/kgbb serta menghentikan mitosis pada stadium metafase. Hal ini diduga disebabkan tingginya kandungan alkaloid yang mempunyai efek sebagai antimitosis dan antitelomeras. Meles dkk. (2004) menyatakan ekstrak daun *Achyranthes aspera* Linn mempunyai efek antimitosis dengan menghambat spermatogenesis tikus dengan hasil menurunkan jumlah

spermatosit, spermatid dan sel Sertoli tetapi tidak menyebabkan penurunan berat testis, diameter dan tebal epitel tubuli seminiferus secara *in vivo*. Meles (2004) mengukur kandungan total alkaloid ekstrak daun *Achyranthes aspera* Linn menggunakan HPLC (*High Performan Liquid Chromatographi*) adalah sebesar 48%.

Beberapa jenis alkaloid yang terdapat dalam tanaman seperti vinblastin, vincristin yang berasal dari tanaman *Cantharanthus rosea*, paclitaxel (taxol) yang berasal dari kulit pohon Yew dan etoposid yang berasal dari pohon Mandrake (*Podophyllum peltatum*) diketahui mempunyai efek sebagai antimitosis dan dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel yang cepat membelah seperti sel kanker (Chabner dkk. 2001).

Dari penggunaan secara empiris, zat yang terkandung di dalam daun *Achyranthes aspera* Linn serta penelitian pendahuluan yang telah dilakukan maka dapat dirumuskan masalah: Apakah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn berpengaruh terhadap fertilisasi, pertumbuhan dan perkembangan embrio (*cleavage*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

Tujuan dari penelitian ini adalah 1) membuktikan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan sigot dan embrio secara *in vitro*; 2) membuktikan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn berpengaruh terhadap integritas membran sigot dan embrio secara *in vitro*; dan 3) menentukan letak kerja (*site of action*) dan mekanisme kerja *Achyranthes aspera* Linn sebagai obat kontrasepsi setelah hubungan seksual (*post coital contraception*). Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi bahwa ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn mempunyai efek sebagai anti mitosis dan antitelomerase dengan menghambat pertumbuhan dan perkembangan embrio sebelum implantasi.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan Penelitian

Daun *Achyranthes aspera* Linn kering sebanyak 1 kg diperoleh dari daerah Malang. Pembuatan ekstrak daun *Achyranthes aspera* Linn dilakukan menurut metode Pharmacope Indonesia. Untuk menentukan adanya alkaloid menggunakan Kromatografi lapis tipis (KLT), sedangkan pengukuran kadar total alkaloid dari ekstrak menggunakan *Hiight Perfprmance Liquid Chromatography* (HPLC).

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus betina (*Ratus norvegicus*), berumur 60 hari, dengan berat badan 200–250 gram, pada umur siap kawin. Pengelompokan tikus dilakukan secara acak.

### Cara Kerja

Hewan percobaan tikus diadaptasikan terhadap lingkungan selama 2 minggu, kemudian dilakukan superovulasi menggunakan PMSG dan HCG masing-masing dengan dosis 1 IU per ekor secara subkutan, 12 jam kemudian dilakukan pembedahan untuk dipanen sel telur. Sel telur tikus dilakukan fertilisasi secara *in vitro*, kemudian dipilih sigot maupun embrio yang baik untuk digunakan sebagai sampel penelitian yang terdiri dari 5 kelompok, tiap kelompok berjumlah 80 buah sel telur/embrio. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut:

Kelompok 1 : sel telur untuk dilakukan fertilisasi

Kelompok 2 : sigot

Kelompok 3 : embrio 2 sel

Kelompok 4 : embrio 4 sel

Kelompok 5 : embrio 8 sel.

Masing-masing kelompok dibagi menjadi 4 perlakuan, sehingga tiap perlakuan berjumlah 20 buah. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

Perlakuan 1 kontrol (P1) : hanya diberi media TCM 199

Perlakuan 2 (P2) : diberi fraksi alkaloid 20 ppm

Perlakuan 3 (P3) : diberi fraksi alkaloid 30 ppm

Perlakuan 4 (P4) : diberi fraksi alkaloid 40 ppm.

Pengamatan terjadinya pembelahan dan perkembangan embrio dilakukan 12 dan 24 jam setelah perlakuan.

### Pengujian terhadap Antifertilitas

Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pemeriksaan dengan parameter sebagai berikut:

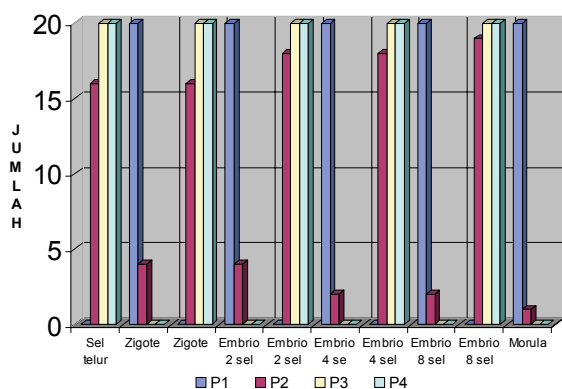
1. Menghitung jumlah sigot hasil fertilisasi
2. Menghitung jumlah embrio yang dapat membelah menjadi 2 sel, 4 sel, 8 sel, dan morulla
3. Menghitung jumlah abnormalitas sigot dan embrio
4. Menentukan fase mitosis dari embrio.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan penelitian menggunakan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn terhadap terjadinya fertilisasi, pertumbuhan dan perkembangan embrio pada tikus secara *in vitro* dengan parameter jumlah sel telur, sigot dan perkembangan embrio (*cleavage*). Hasil pemeriksaan terhadap jumlah sel telur, sigot, perkembangan embrio (*cleavage*) dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada Tabel 1, dapat terlihat bahwa makin besar dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan makin besar pula hambatan pada proses fertilisasi dan perkembangan embrio. Pada pemberian alkaloid *achyranthes aspera* Linn dengan konsentrasi

30 ppm saat fertilisasi, sigot, perkembangan embrio 2 sel, 4 sel dan 8 sel secara *in vitro* sudah terjadi hambatan fertilisasi maupun perkembangan embrio masing-masing sebesar 100%. Ini membuktikan bahwa fraksi alkaloid ekstrak daun *Achyranthes aspera* Linn dengan dosis 30 ppm sudah menunjukkan efektifitas Gill dkk. (2001) dan Juneja dkk. (2001) menyatakan bahwa golongan flavonoid maupun alkaloid tanaman dapat menyebabkan gangguan pada membran sel sehingga berakibat komponen penyusunan membran akan berubah dan proses fisiologi membran akan terganggu dengan terjadi kerusakan dan pengkerutan pada



**Gambar 1.** Jumlah sel telur, zygote dan embrio setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* Linn

membran tersebut. Sel telur maupun embrio mempunyai membran sehingga pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn akan menyebabkan integritas membran terganggu. Yanagimachi (1988) menyatakan perubahan karakteristik akibat alkaloid tanaman yang ditambahkan pada media fertilisasi akan terjadi perubahan membran lipid yang diketahui membantu pemasukan ion kalsium ke dalam sel, peningkatan ion kalsium yang masuk ke dalam membran berakibat merangsang ikatan membran dengan cAMP interseluler. Peningkatan permeabilitas membran sel dapat menyebabkan cairan elektrolit di luar sel akan mudah masuk ke dalam sel, akibatnya sel akan jadi membengkak dan mudah pecah, di samping permeabilitas

membran, berperan juga dalam transportasi nutrisi yang diperlukan untuk metabolisme sel dalam menghasilkan energi. Permeabilitas membran sel telur dan embrio berhubungan erat dengan proses pertumbuhan dan perkembangan embrio (*cleavage*) (Tahiliani dan Kai, 2000). Pengaruh alkaloid pada membran sel telur maupun embrio menyebabkan pengkerutan membran sehingga integritas membran akan menurun dan berpengaruh terhadap perkembangan sel telur dan embrio (*cleavage*) berakibat embrio menjadi mati (Geisert dkk., 1997, Santhanathan dan Trouson 2000, Mitaine dkk., 2001).

Alkaloid dari ekstrak daun *Achyranthes aspera* Linn menyebabkan fertilisasi dihambat dan embrio berhenti membelah dan embrio mengalami disosiasi menjadi sel tunggal. Alkaloid merupakan senyawa penghambat sintesis rRNA pada embrio. Menurut Mitaine dkk., (2001) pemberian alkaloid tanaman seperti glikosida triterpenoid pada embrio 8–16 sel dapat mencegah terjadinya deferensiasi blastomere. Laju normal sintesis protein diperlukan karena pada tahap akhir dari stadium pembelahan sel embrio (*cleavage*) kebutuhan akan protein semakin meningkat. Alkaloid tersebut dapat menghambat sintesis protein dengan cara mencegah polimerisasi DNA dan menghambat transkripsi DNA.

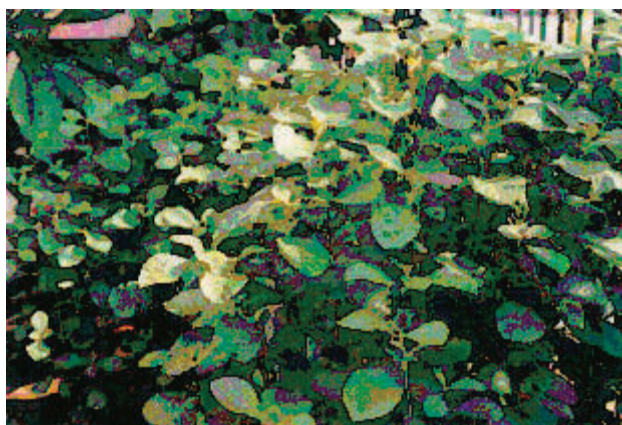
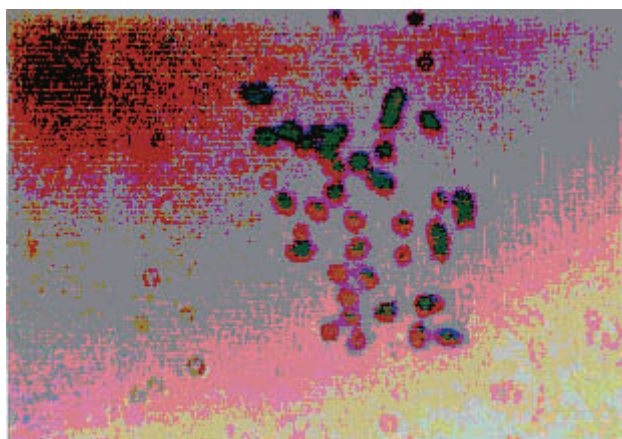
Glikoprotein tuba falopii berperan dalam pembelahan sel embrio pada awal perkembangan embrio, namun mekanismenya masih belum jelas (Hill dkk., 1996). Embrio tikus mensekresi platelet aktivitas faktor (PAF) yang berperan sebagai indikator pada proses terjadinya fertilisasi, implantasi dan pemeliharaan dari korpus luteum (Geisert dkk., 1997, Pantaleon dkk., 2001).

Tidak terjadinya fertilisasi dan berhentinya embrio membelah (*cleavage*) serta abnormalitas dari embrio akibat pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn disebabkan pengkerutan membran sel telur maupun embrio serta terjadi kerusakan embrio dengan terjadinya pengkerutan membran embrio sehingga kemungkinan tanaman *Achyranthes aspera* Linn dapat digunakan sebagai bahan baku obat antifertilitas yang digunakan pascahubungan seksual (*postcoital contraception*).

**Tabel 1.** Jumlah sel telur, Sigot dan embrio tikus setelah pemberian Alakoid *Achyranthes aspera* Linn. secara *in vitro*

Perlakuan	Fertilisasi		Zygot		Embrio 2 sel		Embrio 4 sel		Embrio 8 sel	
	Sel telur	Zygot	Zygot	Embrio 2 sel	Embrio 2 sel	Embrio 4 sel	Embrio 4 sel	Embrio 8 sel	Embrio 8 sel	Morula
AAAL 0 ppm	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20
AAAL 20 ppm	16	4	16	4	18	2	18	2	19	1
AAAL 30 ppm	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0
AAAL 40 ppm	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0

Keterangan: AAAL: Alkaloid *Achyranther aspera* linn

Tanaman *Achyranthes aspera* Linn

Perkembangan embrio berhenti pada stadium metafase

Alkaloid menghalangi siklus sel dengan menghambat pada proses mitosis yang terjadi pada sel telur maupun embrio sehingga sel telur yang telah dibuahi tidak berkembang menjadi sigot dan embrio berhenti membelah. Sel telur yang dibuahi oleh spermatozoa maupun embrio merupakan sel yang sangat cepat perkembangannya atau membelahnya (*cleavage*).

Hasil penelitian ini sel telur maupun embrio dalam berbagai tingkat perkembangan yang ditemukan, berhenti pada mitosis fase metafase. Hal ini sesuai pendapat dari Chabner dkk., (2001) menyebutkan bahwa tanaman *Vinca* yang mengandung alkaloid bekerja spesifik pada siklus sel dengan menghambat proses mitosis. Alkaloid tanaman mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein kedalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran (disolusi) dari mikrotubulus menjadi kristal-kristal kecil yang mengandung setiap 1 mol tubulin terikat oleh 1 mol alkaloid tanaman. Hal ini menyebabkan gangguan (*disruption*) fungsi

mikrotubulus yang berperan dalam proses mitosis dan pembelahan sel terhenti pada metafase. Dengan tidak terbentuknya benang-benang mitosis (*mitotic spindels*) yang utuh menyebabkan kromosom masuk dalam sitoplasma sehingga kromosom menjadi bergerombol (*clump*) seperti bola atau bintang yang disebut dengan *explode mitotic*. Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, pagositosis dan transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel.

Hambatan mitosis pada siklus sel yang terjadi dapat pula menghambat sintesis mikrotubulus dengan mengikat beta tubulin yang spesifik untuk sintesis mikrotubulus. Alkaloid tanaman dapat pula mengantagonisir perbaikan protein sitoskeleton yang menyebabkan pembundelan mikrotubulus dan gangguan dari struktur mikrotubulus yang diikuti dengan penghentian mitosis dan menghambat sintesis DNA secara progresif (Chabner dkk., 2001).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn sebesar 30 ppm secara *in vitro* dapat menghambat fertilisasi, pertumbuhan dan perkembangan sigot maupun embrio pada tingkat perkembangan 2 sel, 4 sel, 8 sel; menyebabkan pengkerutan membran sigot maupun embrio dan degenerasi blastomere dari embrio serta menyebabkan berhentinya pembelahan mitosis sigot maupun embrio pada stadium metafase.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ditjen Dikti, Depdiknas yang telah membiayai melalui Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kontrak Nomer: 21/P2/IPT/DPPM/PHBL/III/2004 Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas.

## KEPUSTAKAAN

- Chabner BA, Rian DP, Paz-Ares L, Carbonero RG, dan Calabresi P, 2001. Antineoplastic Agents. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10<sup>th</sup>. Edition. McGraw-Hill. Medical Publishing Division. p. 1417–1421.
- Chakraborty A, Branther A, Mukainaka T, Konoshima T, Tokuda H, dan Nishino H, 2002. Cancer Chemopreventive Activity of *Achyranthes Aspera* Leaves on Epstein Barr Virus Activation and Two-stage Mouse Skin Carcinogenesis. *Cancer Lett.* 177(1): 1–5.
- Cody V, Middleton E, Harborne JB, dan Borets M, 1997. Progress in Clinical and Biological Research. Plant Flavonoid in Biology and Medicine II. Vol 200. Alan R Liss, Inc. New York.
- DepKes, 1997. Inventaris Tanaman Obat Indonesia (IV). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Hal. 1–2.

- Gao XY, Wang DW, dan Li FM, 2000. Determination of Acdysterone in *Achyranthes Bidentata* and its Activity Promoting Proliferation of Osteoblast-Like Cell. *Yao Xue Xue Bao*. Nov: 35(11): 868–870.
- Geisert RD, Short EC, dan Morgan GL, 1997. Establishmen of Pregnancy in Domestic Farm Species in Embryonic Mortality in Domestic Species. *CRD*. p. 79–141.
- Gill SMK, Balasionor N, dan Parte P, 2001. Intermittent Treatment with Tamoxifen on Reproduction in Male Rat. *Asian J. Andri*. 3(2): 155–158.
- Gomez Y, Velazquez PN, Pelalta ID, Mendez MC, Vilchia F, Juarez MAO, dan E.Pedernera. 2001. Follicle Stimulating Hormone Regulates Steroigenic Enzymes in Culture Cells of The Chick Embryo Ovary. *Gen Comp Endocrinol*. 121(3): 305–315.
- Hill JL, Walker SK, Brown GH, dan Nancarrow CD, 1996. The Effect of an Ovine Oviductal Estrus. Associated Glycoprotein on Early Embryo Development. P. 1367–1369.
- Ida Y, Satch, Katsumata M, Mnagasao, Hirai Y, Kajimoto T, Katada N, Yasuda M, dan Yamamoto, 1998. Two Novel Oleanolic acid Saponin Having a Sialyl Lewis X Mimotic Structure *Achyranthes fauriei* Root. *Bioorg Med Chem.Lett*. 8(18): 2555–2558.
- Juneja P, Gill SMK, Dsouza S, Padwai V, Balasimor N, Aleem M, dan Parte P, 2001. Antifertility Effect of Estradiol in Adult Female Rat. *J.Endocrinol. Invest*. 24(98): 598–607.
- Mardisiswojo S dan Kusuma HR, 1968. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang. Cet. III. PT. Karya Wreda.
- Meles DK, 2004. Kandungan Total Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* linn menggunakan HPLC. Lab. Farmakologi. FK unair.
- Meles DK, Sastrowardoyo W, dan Wurlina, 2004. Efek Antifertilitas dan Uji Reversibilitas Spermatogenik *Achyranthes Aspera* Linn pada *Staging* Spermatogenesis dalam Upaya Penemuan Obat Kontrasepsi.
- Mitaine AC, Marouf A, Haquei B, Bilirakis N, dan Lacaille MA, 2001. Two Triterpenoid and Saponin from *Achyranthes Bidentata*. *Chem. Pharm Bull.* (Tokyo). 49(11): 1492–1494.
- Nigg HN dan Seigler, 1992. *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*. Planum Press. New York. p. 260–276.
- Padmawinata, Kosasih, dan Soetarno S, 1985. Tumbuhan sebagai Sumber Bahan Baku Kontrasepsi Steroid. Kumpulan Naskah Simposium Kontrasepsi Steroid Nabati. FKUI/BKKBN. Jakarta.
- Pantaleon M, Ryan JP, Gill M, dan Kaye PL, 2001. An Usual Subcellular Localization of GLUT I and Link With Metabolism in Oocytes and Preimplantation Mouse Embryos. *Biol Reprod*. 64(4): 1247–1254.
- Santhanathan AH dan Trouson OA, 2000. Mitochondrial Morphology During reimplantation Human Embryogenesis. *J. Human of Reproduction. Suppl*. 2: 148–159.
- Tahiliani P dan Kai A, 2000. *Achyranthes Aspera* Elevates Thyroid Hormone Levels and Decrease Hepatic Lipid feroxidation in Female Rats. *J. Ethnopharmacol*. 7(3): 527–532.
- Unchendu CN, Kamalu TN, dan Asuzu IU, 2000. A Preliminary Evaluation Antifertility of Triterpenoid Glicoside (DSS) from *Dalbergra Saralitis* in Female Wistar Rats. *Pharmacol Ras*. 41(5): 521–525.
- Wei S, Liang H, Zhao Y, dan Zhang R, 1997. Separation and Identification of the Compounds from *Achyranthes Bidentata*. *Zhogguo Zhong yao Za Zhi*. 22(5): 293–295, 319–320.
- Wurlina, 2000. Efek Antifertilitas infusa daun *Achyranthes Aspera* Linn terhadap Siklus Birahi pada mencit. Lab. Kemajiran FKH Unair.
- Wurlina dan Sastrowardoyo W, 2002. Pengaruh Ekstrak *Achyranthes Aspera* linn terhadap Perkembangan Embrio (Cleavage) Mencit (*Mus Musculus*). Lemlit. Unair.
- Wurlina, Sastrowardoyo W, dan Meles DK, 2003. Pengaruh Antimitosis Ekstrak *Achyranthes aspera* linn pada pembelahan Sel Embrio (Cleavage) dalam Upaya penemuan Obat Antifertilitas setelah Hubungan Seksual (Post Coital Contraception). Lemlit. Unair.
- Yanagimachi R, 1988. *Mammalia Fertilization In: Knobil E Neil. JD. The Physiology of Reproduction*. Reven Press. Ltd. New York 5: 138–152.

Reviewer: **Tim Reviewer**  
**Seminar Biologi Nasional tahun 2005**  
**Surabaya**