

**JURNAL METAMORFOSA**  
**Journal of Biological Sciences**

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

**Pemberian Ekstrak Etanol Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) Menurunkan Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Dewasa Muda**

**Administration of Fenugreek Seed (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) Ethanol Extract Reduces Spermatozoa Quality of Young Adult Mice (*Mus musculus*)**

**Putu Susilawati<sup>1\*</sup>, Bagus Komang Satriyasa<sup>2</sup>, I Gusti Ayu Widianti<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Ilmu Kedokteran Reproduksi Universitas Udayana, Denpasar

<sup>2</sup>Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

<sup>3</sup>Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

Email: [susilawati.bali91@gmail.com](mailto:susilawati.bali91@gmail.com)

**INTISARI**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) dapat menurunkan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) dewasa muda sebagai bahan kontrasepsi pria alami. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post-test only control group design*. Sampel penelitian ini terdiri dari 36 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan galur *Swiss Webster* usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram yang dibagi menjadi dua kelompok secara acak. Kelompok kontrol ( $P_0$ ) diberikan CMC Na 0,3% sebanyak 0,5 ml dan kelompok perlakuan ( $P_1$ ) diberikan ekstrak etanol Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) 0,4 mg/gram BB sebanyak 0,5 ml selama 36 hari per oral. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) dapat menurunkan kualitas (konsentrasi, motilitas, viabilitas, dan morfologi) spermatozoa ( $P \leq 0,05$ ), sehingga Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) memiliki potensi sebagai bahan alami kontrasepsi pria.

**Kata kunci:** kontrasepsi, ekstrak Biji Klabet, kualitas spermatozoa mencit

**ABSTRACT**

This study aimed to determine the activity of the ethanol extract of Fenugreek Seed (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) to reduce the sperm quality of young adult mice (*Mus musculus*) as a natural male contraceptive. This research is an experimental study using a post-test only control group design. The sample of this study consisted of 36 male Swiss Webster (*Mus musculus*) mice aged 2-3 months with a body weight of 20-30 grams which were divided into two groups randomly. The control group ( $P_0$ ) was given 0.5 ml of CMC Na 0.3% and the treatment group ( $P_1$ ) was given the ethanol extract of Fenugreek Seed (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) 0.4 mg/gram BW as much as 0.5 ml for 36 day orally. The results showed that the administration of ethanol extract of Fenugreek Seed (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) could reduce the quality (concentration, motility, viability, and morphology) of spermatozoa ( $P \leq 0.05$ ), so that Fenugreek Seed (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) has potential as a natural male contraceptive.

**Keyword:** contraception, fenugreek seed extract, mouse spermatozoa

## PENDAHULUAN

Partisipasi pria dalam menggunakan metode kontrasepsi masih tergolong rendah yaitu 7,5% dibandingkan dengan partisipasi wanita 63,6%, sehingga partisipasi pria menjadi masalah dalam peningkatan cakupan program Keluarga Berencana (KB) (SDKI, 2017). Salah satu alasan yang menyebabkan rendahnya partisipasi pria dalam menggunakan metode kontrasepsi, yaitu pilihan kontrasepsi pria modern yang masih terbatas pada kondom dan vasektomi. Kondom memiliki tingkat kegagalan kontrasepsi yang tinggi, yaitu 12 dari 100 pasangan hamil selama tahun pertama penggunaan sedangkan metode vasektomi bersifat invasif dan proses untuk mengembalikannya memerlukan prosedur operasi yang rumit serta biaya yang mahal (Jing *et al.*, 2016).

Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) berasal dari *family Leguminosae* diduga memiliki aktivitas antifertilitas. Biji Klabet mengandung senyawa saponin steroid, salah satunya berupa *diosgenin* yang merupakan prekursor penting untuk sintesis sejumlah hormon steroid, termasuk testosteron dan estrogen (Nursetiani *and* Herdiana, 2018) serta mengandung senyawa estrogenik atau fitoestrogen, yaitu alkaloid dan flavonoid (Nageh *and* Elrayess, 2018). Pohon dan Biji Klabet dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Tanaman Klabet (Kiri) dan Biji Klabet (Kanan) (Bahmani *et al.*, 2016).

Fitoestrogen merupakan polifenol dan non steroid yang terdapat dalam tanaman, memiliki struktural mirip dengan  $17\beta$ -estradiol sehingga dapat bertindak sebagai agonis dan antagonis estrogen (Giwerzman, 2011). Efek tersebut dimediasi dengan mengikat reseptor estrogen, perubahan konsentrasi estrogen endogen, serta merangsang *sex hormone binding globulin*

(SHBG) (Aronson, 2016). Penelitian Nita *et al.* (2016) menunjukkan adanya penurunan berat dan struktur histologis testis dan epididimis tikus *Sparague Dawley* yang diberikan fraksi saponin yang terkandung dalam Biji Klabet.

Berdasarkan permasalahan dan pemaparan di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) dewasa muda.

## BAHAN DAN METODE

Sebelum dilakukan penelitian, diajukan ke tim Komisi Etik untuk mendapatkan *Ethical Clearance* (EC) dengan No sertifikat 884/UN 14.2.2.VII.14/LT/2021. Mencit jantan (*Mus musculus*) dewasa muda galur *Swiss Webster* digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian ini. Biji Klabet yang digunakan sebanyak 1,5 kg kemudian dikeringkan dan diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk Biji Klabet diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol sehingga diperoleh 30 gram ekstrak kental. Kelompok kontrol (K) diberikan larutan CMC Na 0,3 % sebanyak 0,5 ml/mencit. Kelompok perlakuan (P) diberikan ekstrak etanol Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) dengan dosis 0,4 mg/gram BB secara oral selama 36 hari, karena hasil penelitian pendahuluan menunjukkan pemberian ekstrak etanol Biji Klabet dengan dosis 0,4 mg/gram BB, selama 36 hari secara oral dapat menurunkan kualitas spermatozoa secara signifikan..

Setelah masa perlakuan, mencit jantan dieuthanisia menggunakan *Ketamine* dan *Xylazine* (1:1) sebanyak 0,02 cc kemudian dibedah dan diambil bagian kauda epididimisnya. Kauda epididimis mencit diletakkan dalam larutan NaCl 0,9% sebanyak 2 ml pada cawan arloji kemudian dipotong bagian proksimal kauda dengan metode cacah hingga terbentuk suspensi spermatozoa, kemudian dilakukan analisis semen (konsentrasi, motilitas, viabilitas, dan morfologi) spermatozoa di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x. Dilakukan

3x pengulangan penghitungan selanjutnya diambil rata-ratanya dan dikalikan 100%.

#### a. Pemeriksaan Konsentrasi Spermatozoa

Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa menggunakan *Haemocytometer Improve Neubauer*. Suspensi spermatozoa diambil sebanyak 50  $\mu$ l menggunakan pipet *eritrocyt* kemudian diencerkan dengan menambahkan NaCl 0,9% dengan perbandingan 1:20 (1+19). Selanjutnya suspensi spermatozoa di homogenkan dengan cara mengoyangkan pipet *eritrocyt* seperti angka 8 selama 2-3 menit. Buang 1-2 tetes semen terlebih dahulu kemudian tuangkan satu tetes semen pada kamar hitung *Improve Neubauer* dan ditutup dengan *cover glass* Spermatozoa dihitung pada 3 kamar hitung (5, 4, dan 6). Untuk penghitungan konsentrasi spermatozoa digunakan rumus (WHO, 2021):

$$C = (N/n) \times (1/20) \times \text{faktor pengencer}$$

Keterangan:

*C* : konsentrasi spermatozoa

*N* : jumlah spermatozoa

*n* : jumlah total baris yang diperiksa pada kamar hitung 5, 4, dan 6

#### b. Pengamatan Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa diamati dengan meneteskan satu tetes suspensi spermatozoa pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass*. Pergerakan spermatozoa dihitung sebanyak 200 sperma per ulangan dengan 4 (empat) kategori, yaitu progresif cepat, progresif lambat, non progresif, dan imotil (WHO, 2021).

#### c. Pengamatan Viabilitas Spermatozoa

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan membuat *smear*. Suspensi spermatozoa sebanyak satu tetes diteteskan diujung *object glass* kemudian ditambahkan dengan satu tetes Eosin Y 1%. *Object glass* lain diletakkan pada ujung campuran tersebut dengan membentuk sudut 45° dan ditarik kearah ujung yang

lain. Kepala spermatozoa berwarna merah berarti spermatozoa tersebut mati sedangkan kepala spermatozoa yang berwarna putih berarti spermatozoa tersebut hidup (WHO, 2021).

#### d. Pengamatan Morfologi Spermatozoa

Pengamatan morfologi spermatozoa menggunakan metode pewarnaan Safranin-Kristal Violet Suspensi spermatozoa sebanyak 0,2-0,3 cc diteteskan pada *object glass*, kemudian dibuat *smear* dan diangin-anginkan. Selanjutnya difiksasi dengan methanol 99% selama 5 menit dan dicelupkan ke dalam safranin selama 5 menit. Selanjutnya, dicelupkan ke buffer fosfat I pH 6,8 dan buffer II pH 6,8 kemudian dicelupkan ke kristal violet 0,25 gr% selama 5 menit, dibilas, dan tunggu kering. Pengamatan morfologi spermatozoa mengevaluasi 200 spermatozoa per ulangan dengan mengamati bagian kepala dan ekor spermatozoa (WHO, 2021).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Data yang diperoleh dari hasil dari pengamatan spermatozoa dianalisis secara statistik dengan uji *Independent T-Test* taraf 5%. Hasil analisis menunjukkan adanya penurunan rerata konsentrasi, motilitas, viabilitas, serta peningkatan morfologi abnormal spermatozoa menciit (*Mus musculus*) dengan nilai  $p=0,000$  ( $p \leq 0,05$ ). Tabel 1 menunjukkan perbedaan rerata data kualitas spermatozoa pada kedua kelompok.

**Tabel 1.** Rerata Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Dewasa Muda

Kriteria	Kelompok	Rerata±SD	p
Konsentrasi	K	136,7±5,3	0,000
	P	94,7±8,3	
Motilitas Progresif Cepat	K	38,1±4,5	0,000
	P	22,0±1,9	
Motilitas Progresif Lambat	K	28,1±3,5	0,000
	P	21,9±3,2	
Motilitas Non Progresif	K	21,4±3,6	0,000
	P	29,9±3,4	
Motilitas Imotil	K	12,1±1,5	0,000
	P	26,0±5,4	
Viabilitas Hidup	K	90,8±1,2	0,000
	P	71,2±5,9	
Viabilitas Mati	K	9,1±1,2	0,000
	P	28,7±5,9	
Morfologi Normal	K	85,4±5,9	0,000
	P	56,9±10,1	
Morfologi Abnormal	K	14,5±5,9	0,000
	P	43,0±10,1	

**Keterangan**

K: Kelompok Kontrol

P: Kelompok Perlakuan

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada Biji Klabet, yaitu saponin, alkaloid, flavonoid, serta triterpenoid (Hasil Fitokimia, 2021) diduga menyebabkan kualitas spermatozoa menjadi menurun Biji Klabet diduga memiliki efek estrogenik karena mengandung senyawa steroidal fitoestrogen, yaitu saponin (*diosgenin*) yang merupakan prekursor pembentukan hormon steroid sehingga dapat menimbulkan agonis, antagonis atau memiliki aktivitas campuran untuk reseptor steroid manusia dan hewan (Setiabudy, 2016). Senyawa alkaloid dan flavonoid juga dilaporkan memiliki aktivitas estrogenik dan disebutkan

memiliki potensi sebagai senyawa fitoestrogen (Folwarczna *et al.*, 2014; Nikolić *et al.*, 2017). Fitoestrogen secara kompetitif berikatan dengan *estrogen receptor* (ER), apabila konsentrasi senyawa fitoestrogen atau estrogen eksogen lebih tinggi sedangkan konsentrasi estrogen endogen normal, maka dapat menyebabkan umpan balik negatif pada hipotalamus dan hipofisis (Giwerzman, 2011). Umpan balik negatif ini menyebabkan penurunan sekresi *Gonadotropin Relasing Hormone* (GnRH) pada hipotalamus, sehingga berpengaruh pada sekresi kelenjar hipofisis anterior, yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Penurunan sekresi FSH menyebabkan fungsi sel Sertoli untuk mensintesis *Androgen Binding Protein* (ABP) menjadi terhambat. ABP berperan dalam mengikat androgen dan bertindak sebagai protein yang membawa testosteron ke dalam tubulus seminiferus. Penurunan sekresi LH menghambat fungsi sel Leydig untuk menstimulasi steroidogenesis (memproduksi testosteron). Produksi testosteron menurun menyebabkan penurunan serum estrogen endogen (Haschek *et al.*, 2010).

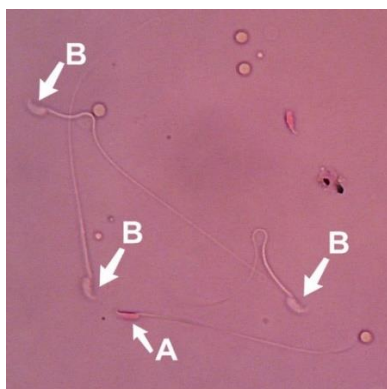
Penelitian Al-Yahya (2013) menunjukkan pemberian Klabet pada mencit *Swiss Albino* dapat meningkatkan serum estradiol, menurunkan testosteron, serta menurunkan konsentrasi spermatozoa. Sugiantari *et al* (2020) juga menunjukkan konsentrasi spermatozoa tikus putih jantan mengalami penurunan setelah diberikan seduhan daun kelor. Hal ini diduga disebabkan oleh senyawa fitokimia yang terkandung pada daun kelor berupa flavonoid, alkaloid, dan steroid.

Penurunan FSH dan testosteron dapat mengganggu perlekatan sel germinal ke sel Sertoli serta menghambat pelepasan spermatozoa matang dari sel Sertoli. Spermatozoa matang difagosit oleh sel Sertoli, apabila tidak ada stimulasi testosteron sehingga konsentrasi spermatozoa menjadi menurun (Ramaswamy and Weinbauer, 2014).

Senyawa triterpenoid diduga memiliki peran dalam penghambatan saluran kalsium melalui menghambat aktivasi saluran *Catsper* yang dimediasi oleh progesteron (P4), sehingga

dapat menurunkan motilitas spermatozoa. Senyawa triterpenoid diduga dapat menghambat aktivitas enzim *monoasilgliserol lipase* (MAGL), yang pada akhirnya menghambat hidrolisis *2-arachidonoylglyceol* (2-AG) menjadi asam arakidonat (AA) dan gliserol. Penghambatan pada langkah ini memblokir saluran Catsper karena 2-AG bertindak sebagai inhibitor CatSper endogen (Mannowetz *et al.*, 2017).

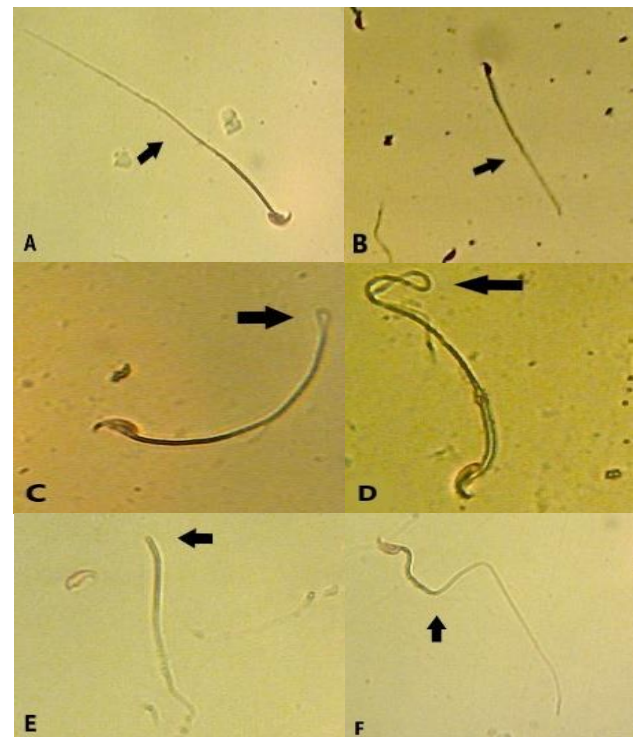
Senyawa saponin juga menunjukkan sifat spermisida, yaitu menyebabkan kerusakan struktur membran sel spermatozoa serta menyebabkan gangguan pada integritas fungsional membran plasma sel spermatozoa sehingga terjadi penurunan viabilitas spermatozoa (Dubey R dan Dubey K, 2019). Interaksi antara saponin dan kolesterol dapat mengganggu permeabilitas membran sel dengan memengaruhi sistem transportasi membran sel, sehingga mengakibatkan terjadinya gangguan keseimbangan osmotik pada membran sel spermatozoa. Adanya gangguan keseimbangan osmotik pada membran sel dapat menyebabkan kematian sel spermatozoa (Sefrioui *et al.*, 2021).



**Gambar 2.** Viabilitas Spermatozoa. A: Spermatozoa mati. B: Spermatozoa hidup (Sumber: Data Pribadi, 2021).

Senyawa alkaloid diduga dapat menurunkan kadar enzim antioksidan seperti; enzim *katalase*, *glutathione peroksidase*, dan kadar asam sialat yang menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) di epididimis sehingga dapat mengganggu pematangan dan penyimpanan spermatozoa di epididimis yang mengarah pada abnormalitas

spermatozoa (Shunnarah *et al.*, 2021). Terganggunya regulasi hormon pada poros hipotalamus-hipofisis oleh karena senyawa alkaloid menyebabkan terjadinya penurunan FSH sehingga dapat menghambat tugas dari sel Sertoli sebagai penyedia nutrisi serta bahan untuk stimulasi pertumbuhan sel-sel germinal sehingga dapat menyebabkan pelepasan spermatozoa prematur dan abnormalitas spermatozoa (Oduwole *et al.*, 2018).



**Gambar 3.** Morfologi Spermatozoa dengan Pewarnaan Safranin-Kristal Violet. Keterangan: A dan B: Spermatozoa Normal, C dan D: Ekor Bergulung, E: Ekor Tanpa Kepala/Kepala Putus, F: Leher Bengkok (Sumber: Data Pribadi, 2021).

**KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) dapat menurunkan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) dewasa muda sehingga Biji Klabet berpotensi sebagai bahan alami kontrasepsi pria.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Al-Yahya, A. 2013. Reproductive, cytological and biochemical toxicity of fenugreek in male Swiss albino mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7(29): 2072-2080.
- Aronson, J.K. 2016. Phytoestrogens. *Meyler's Side Effects of Drugs* 755–757.
- Bahmani, M., Shirzad, H., Mirhosseini, M., Mesripour, A., and Rafieian-Kopaei, M. 2016. A Review on Ethnobotanical and Therapeutic Uses of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L). *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 21(1): 53–62.
- Dubey, R. dan Dubey K. 2019. Sperm Immobilization Potential of Saponin Extract of *Ziziphus mauritiana*. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 9(2-A): 78-80.
- Folwarczna, J., Zych, M., Nowińska, B., Pytlik, M., dan Janas, A. 2014. Unfavorable effect of trigonelline, an alkaloid present in coffee and fenugreek, on bone mechanical properties in estrogen-deficient rats. *Mol. Nutr. Food Res* 58: 1457-1464.
- Giwerzman, A. 2011. Estrogens and phytoestrogens in male infertility, *Current Opinion in Urology* 21(6): 519–526.
- Haschek, W. M., Rousseaux, C.G., Wallig, M. A.. 2010. Chapter 18 - Male Reproductive System. *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Elsevier Inc. pp 553-597.
- Jing C., Stephanie T. P., dan Richard A. A. 2016. Male contraception. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 176(5): 139–148.
- Mannowetz, N., Miller, M. R., & Lishko, P. V. 2017. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(22): 5743–5748.
- Nageh, H. dan Elrayess, R. A. 2018. Evaluation of *Trigonella foenum graecum* L. (Fenugreek) seeds efficiency in enhancing male reproductive health | *Trigonella foenum-graecum*; Fenugreek; male reproductive health; infertility. *Kenkyu Publishing Group* (3): 1–3.
- Nikolić, I.L, Ivana M. Savić-Gajić, Tačić, A., Savić, I.M. 2017. Classification and Biological Activity Of Phytoestrogens: A Review. *Advanced technologies* 6(2): 96-106.
- Nita, S., Habisukan, U. dan Zen, N. 2016. Saponin Biji Klabet pada Organ Reproduksi Tikus Jantan Sprague Dawley®, *Jurnal Penelitian Sains* 18(2): 59-65.
- Nursetiani, A. dan Herdiana, Y. 2018. Potensi Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) Sebagai Alternatif Pengobatan Herbal: Review Jurnal. *Farmaka* 16(2): 475–484.
- Oduwole, O. O., Peltoketo, H. dan Huhtaniemi, I. T. 2018. Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology* 9 (763): 1–11.
- Ramaswamy, S., dan Weinbauer, G. F. 2015. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2): e996025.
- SDKI. 2017. Survey Demografi dan Kesehatan Indonesia, *Survei Demografi dan Kesehatan Indonesia*.
- Sefrioui, M. R., Othmani, I.S.E., Filali, H., Derfoufi, S., Derraji, S., Benmoussa, A., dan Said, A. A.H. 2021. Evaluation of spermicidal activity of saponosides from *Saponaria officinalis* / Caryophyllaceae, *Glycyrrhizia glabra* / Fabaceae and *Herniaria glabra* / Caryophyllaceae. *Medicine and Pharmacy Reports* 94(2): 239 - 247.
- Setiabudy, M. 2016. Pemberian Ekstrak Biji Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Secara Oral Meningkatkan Kadar estrogen Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina Galur Wistar Menopause (Thesis), Denpasar: Universitas Udayana.
- Shunnarah, A., Tumlinson, R., dan Calderón,

A.I. 2021. Natural Products with Potential for Nonhormonal Male Contraception. *Journal of Natural Product*.

Sugiantari, I, A. P., Suaskara, I.B.M., dan Suarni, N.M.R. 2020. Konsentrasi Spermatozoa Dan Ketebalan Tubulus Seminiferus Tikus Putih Jantan Setelah Pemberian Seduhan Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.). *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences* 7(2): 24-247.

WHO. 2021. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (Sixth edition).