

TESIS

**PENGARUH FRAKSI ETANOL 96% DAN ISOLAT BIJI
KORO BENGUK (*Mucuna pruriens* L.) TERHADAP KUALITAS
SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus*)
TERPAPAR 2-METOKSIETANOL**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



SRI WINARNI

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**PENGARUH FRAKSI ETANOL 96% DAN ISOLAT BIJI
KORO BENGUK (*Mucuna pruriens* L.) TERHADAP
KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus*)
TERPAPAR 2-METOKSIETANOL**

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Tanggal Ujian Tesis: 9 Agustus 2010

Oleh:

**Sri Winarni
NIM. 090810206 M**

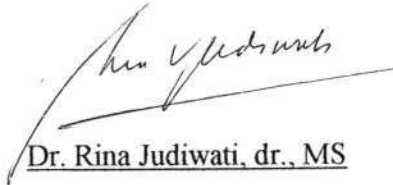
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 9 Agustus 2010

Oleh:


Pembimbing Ketua



Dr. Rina Judiwati, dr., MS

NIP. 131653737

Pembimbing



Dr. Bambang Prajogo, EW., MS, Apt.

NIP. 19561217 198503 1 004

Mengetahui:

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K)

NIP. 140 092 103

Telah diuji pada

Tanggal 9 Agustus 2010

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K)

Anggota : 1. Dr. Rina Judiwati, dr, MS.

2. Dr. Bambang Prajogo, EW, MS, Apt.

3. Dr. Alfiah Hayati Dra. MKes.

4. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr, MKes.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala kasih sayang dan kemudahan yang diberikan-Nya sehingga tesis ini dapat selesai dan memberikan manfaat untuk diri saya sendiri dan orang lain yang membacanya.

Saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan dan Kebudayaan atas bantuan finansial sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga (Prof. Dr. H. Fasich, Apt.) atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga (Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, SH., MS.) atas kesempatan menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (Prof. Dr. Muhammad Amin, dr.Sp.P(K)) atas kesempatan yang diberikan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister di Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi FK Unair.
4. Dr. Rina Judiwati, dr, MS selaku pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, saran, dan kritik yang membangun dari awal penulisan proposal hingga tesis ini selesai.
5. Dr. Bambang Prajogo, EW, MS, Apt. selaku pembimbing yang sudah memberikan bimbingan, saran, kritik, dan motivasi dengan penuh perhatian.
6. Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Diponegoro (Dra. V.G. Tinuk Istiarti, M.Kes) atas bantuan yang diberikan selama saya menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
7. Ketua TKPSM Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menjadi mahasiswa Program Magister di Unair.
8. Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Unair, dan penguji tesis, Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., Sp. OG. (K), atas segala masukan dan perhatiannya selama ini sehingga tesis ini dapat diselesaikan tepat waktu.
9. Dr. Alfiah Hayati Dra. Mkes. dan Dr. Hari Basuki Notobroto, dr, Mkes., selaku penguji tesis atas segala masukan yang diberikan dan terima kasih atas semua bantuan dan bimbingan selama melaksanakan penelitian karena tanpa bantuan mereka maka pelaksanaan penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.
10. Dr. Dra. Dwi Winarni, MS., atas semua bantuan dan bimbingan selama melaksanakan penelitian karena tanpa bantuan mereka maka pelaksanaan penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.
11. Tim Laboratorium Biologi Fakultas Sainstek Unair, Laboratorium Fitofarmaka dan Farmakognosi Unair, LPPT Unit I Universitas Gadjah Mada,

- dan bagian pemeliharaan hewan percobaan, Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
12. Kedua orangtua saya (Sumarlan dan Untarti), Ibu mertua saya (Hj. Sri Istiadi Rahayu, SH), adikku (Wawan) dan seluruh keluarga yang telah memberikan doanya hingga saya berhasil menyelesaikan studi ini.
 13. Spesial untuk suamiku tercinta (R. Imanu Danar Herunandi, ST), terima kasih atas semua kasih sayang, dukungan, do'a, dan kesabarannya selama istriku ini menjalani studi.
 14. Buah hatiku yang tercinta (Dito dan Rian), atas do'amumu, keceriaan, dan kelucuanmu yang memberikan tambahan semangat kepada mama untuk bisa menyelesaikan studi ini dengan cepat.
 15. Teman-teman IKR 2008: Bu Sum, Mbak Yayuk, Mbak Iis, Mbak Mei, Mbak Lestari, Mbak Henny dan Mbak Dina. Memori yang begitu indah bersama kalian semua, semoga selalu menjadi kenangan indah untuk kita semua.
 16. Bu Martini, Pak Agam, dan teman kantor yang lain, yang telah memberikan semangat dan dukungannya.
 17. Teman-teman kos (Dik Wulan dan Mbak Yayuk), yang selalu bersama dalam duka maupun suka di kos kita tercinta, Jl. Karang Menjangan IV No. 36, Surabaya.
 18. Semua pihak yang telah banyak membantu studi saya hingga tesis ini selesai, yang namanya tidak dapat disebutkan satu-persatu.
- Saya sebagai manusia biasa yang tidak lepas dari salah dan khilaf, memohon maaf kepada semua pihak atas segala kekurangan dan kesalahan yang pernah saya perbuat.

Surabaya, Agustus 2010

Sri Winarni

RINGKASAN

**PENGARUH FRAKSI ETANOL 96% DAN ISOLAT BIJI
KORO BENGUK (*Mucuna pruriens* L.) TERHADAP KUALITAS
SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus*)
TERPAPAR 2-METOKSIETANOL**

Beberapa penelitian terdahulu (India), dengan penanganan dan pengolahan yang tepat tanaman *Mucuna pruriens* L. (*Papilionaceae*) yang dikenal di daerah dengan nama koro benguk mempunyai potensi yang sangat tinggi. Pada hewan coba, tanaman ini terbukti dapat meningkatkan aktifitas seksual hewan coba tikus putih jantan yang normal. Selain itu juga dimanfaatkan sebagai obat herbal untuk meningkatkan kualitas sperma, memperbaiki profil semen dan parameter biokimia seminal plasma, dan meningkatkan fertilitas pria. Semua ini didukung oleh bahan yang terdapat pada *Mucuna pruriens*. Terutama kandungan mikroelemen non protein asam amino (-)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine (L-dopa).

Berdasarkan kandungan L-dopa yang tinggi, maka *M pruriens* diupayakan dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal dalam penanganan infertilitas, seperti penelitian sebelumnya, disamping manfaat yang sering diperoleh dari pembuatan tempe benguk. Hal ini mengingat infertilitas dalam dekade terakhir ini semakin meningkat.

Insiden infertilitas meningkat sejak 40 tahun terakhir. Kurang lebih 10-15% jumlah penduduk mengalami infertilitas. Aesoph (1998) menjelaskan bahwa 10-15% pasangan suami isteri infertil. Dikatakan bahwa 50% kasus infertil faktor pria terlibat di dalamnya, baik sebagai problem primer atau kombinasi dengan pasangan wanitanya. Ada pendapat lain bahwa penyebab infertil 40% dari pihak pria dan 40% terdapat pada wanita serta 30% pada pihak pria dan wanita. Olsen melaporkan bahwa konsentrasi spermatozoa berkurang sebanyak 50% dalam kurun waktu 50 tahun (1940-1990). Adanya penurunan konsentrasi sperma dari 113 juta spermatozoa/ml menjadi 66 juta spermatozoa/ml. Data rata-rata konsentrasi spermatozoa kelompok infertil selama satu tahun di poli Andrologi FK Unair-RSUD Dr. Soetomo (1993) adalah 21,1 juta/ml.

Faktor yang menyebabkan infertilitas antara lain hormon, infeksi, radiasi, obat dan bahan kimia baik yang alami maupun sintetis, yang dapat berinteraksi dengan sistem endokrin.

Keberhasilan proses fertilisasi salah satunya dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa yang dihasilkan dari testis. Hal ini sesuai dengan hasil ESHRE Capri Workshop tahun 2000 dalam *royal college of obstetricians and gynaecologist* (RCOG) yang menyatakan bahwa sperma analisa merupakan penentu pertama diagnosa infertilitas disamping patensi tuba, diagnosis ovulasi. Untuk itu diperlukan usaha untuk memperbaiki kualitas spermatozoa. Perbaikan kualitas spermatozoa bisa melalui non hormonal (makanan, suplemen, pola hidup) dan hormonal. Dalam hal perbaikan kualitas spermatozoa lewat jalur non hormonal bisa melalui biji *Mucuna pruriens*, mengingat efek dari bahan aktif biji tersebut.

Biji *Mucuna pruriens* lebih baik daripada obat sintetik, karena berasal dari herbal dan mengandung bahan lain yang dimungkinkan bermanfaat bagi tubuh. Untuk itu, diperlukan biji *Mucuna pruriens* yang berkualitas dan tidak mengandung bahan toksik (HCN dan residu pestisida). Berdasarkan pemeriksaan dengan menggunakan HPLC, ditemukan kandungan L-dopa dalam fraksi etanol 96% biji *Mucuna pruriens* sebesar 14,7%. Sedangkan dalam isolat sebesar 56,57%.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh fraksi etanol 96% dan isolat biji *Mucuna pruriens* terhadap kualitas spermatozoa mencit yang terpapar 2-Metoksietanol. Mencit yang digunakan sebagai subjek penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan, strain BALB/C dewasa, sudah dikawinkan dan terbukti fertil, umur 8 minggu dan berat badan 25-30 gram. Penelitian ini bersifat eksperimental. Jenis rancangannya adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Subjek penelitian terdiri dari 11 kelompok yang dipilih secara acak dan telah dihomogenkan. Lima kelompok sebagai kontrol (negatif dan positif), 3 kelompok sebagai kelompok perlakuan fraksi yang diberikan injeksi subcutan 2-ME 100 mg/kg.bb/ hari selama 12 hari, kemudian dilanjutkan dengan fraksi etanol 96% yang dimulai dari dosis 14 mg/kg.bb/hari (P1), 28 mg/kg.bb/hari (P2), dan 56 mg/kg.bb/hari (P3) selama 51 hari, dan 3 kelompok yang terakhir sebagai kelompok perlakuan isolat dimana diberikan injeksi subcutan 2-ME 100 mg/kg.bb/ hari terlebih dahulu selama 12 hari, kemudian dilanjutkan dengan isolat yang dimulai dari dosis 1,4 mg/kg.bb/hari (P4), 2,8 mg/kg.bb/hari (P5), dan 5,6 mg/kg.bb/hari (P6) selama 51 hari. Pengamatan akhir adalah menghitung jumlah spermatozoa, kecepatan motilitas, persentase viabilitas spermatozoa, dan persentase morfologi spermatozoa normal.

Hasil penelitian ini diperoleh data yang menyatakan bahwa pemberian 2-ME 100 mg/kg.bb/hari selama 12 hari tidak mempengaruhi jumlah spermatozoa mencit. 2-ME tersebut hanya mempengaruhi kecepatan motilitas, persentase viabilitas spermatozoa, dan persentase morfologi spermatozoa normal. Median dari jumlah spermatozoa kelompok kontrol = 2,25%, P1 = 5,15%, P2 = 4,82%, P3 = 4,88%, P4 = 5,57%, P5 = 5,13%, dan P6 = 6,52%. Rata-rata kecepatan motilitas spermatozoa kelompok kontrol = $4,54 \pm 0,61$ $\mu\text{m}/\text{detik}$, P1 = $7,36 \pm 1,05$ $\mu\text{m}/\text{detik}$, P2 = $7,68 \pm 0,86$ $\mu\text{m}/\text{detik}$, P3 = $8,04 \pm 0,96$ $\mu\text{m}/\text{detik}$, P4 = $8,53 \pm 1,17$ $\mu\text{m}/\text{detik}$, P5 = $9,07 \pm 0,75$ $\mu\text{m}/\text{detik}$, dan P6 = $9,31 \pm 0,51$ $\mu\text{m}/\text{detik}$. Median dari persentase viabilitas spermatozoa kelompok kontrol = 81 %, P1 = 83,5%, P2 = 84,5%, P3 = 87%, P4 = 85%, P5 = 86%, dan P6 = 88%. Median dari persentase morfologi spermatozoa normal kelompok kontrol = 84,5%, P1 = 94,5%, P2 = 94%, P3 = 95%, P4 = 95,5%, P5 = 95%, dan P6 = 96%.

Semua kelompok dan variabel diuji normalitasnya dengan *one-sample Kolmogorov-smirnov test*, yang menyatakan semua berdistribusi normal ($p > 0,05$). Data variabel yang ratio (kecepatan motilitas), diuji dengan Anova satu arah. Sedangkan data variabel yang ordinal (jumlah spermatozoa, persentase viabilitas, dan persentase morfologi spermatozoa normal), diuji dengan analisis *Kruskal-wallis test*.

Uji komparasi yang digunakan adalah uji Anova satu arah dan uji *Kruskal-wallis test* pada taraf kepercayaan 95%. Hasil uji Anova satu arah menyatakan bahwa kecepatan motilitas memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik

pada berbagai kelompok perlakuan ($p < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji LSD.

Hasil uji LSD, menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan kecepatan motilitas antara kelompok kontrol positif (L-dopa standart) dengan kelompok perlakuan fraksi dosis I sampai III dan isolat dosis I sampai III. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan kecepatan motilitas antar kelompok perlakuan fraksi etanol 96% dan isolat.

Ada perbedaan yang signifikan kecepatan motilitas antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan fraksi dan isolat berbagai dosis dan antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif.

Hasil uji *Kruskal-wallis test* menyatakan bahwa jumlah, persentase viabilitas dan persentase morfologi spermatozoa normal memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik pada berbagai kelompok perlakuan ($p < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann-whitney test*.

Hasil uji *Mann-whitney test*, menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan jumlah spermatozoa antara kelompok kontrol dengan kelompok kontrol positif dan isolat dosis I, antara kelompok kontrol positif dengan isolat dosis I sampai III dan antar kelompok isolat. Ada perbedaan yang signifikan jumlah spermatozoa antara kelompok kontrol negatif dengan perlakuan isolat dosis II dan III.

Tidak terdapat perbedaan yang signifikan persentase viabilitas spermatozoa antara kelompok kontrol dengan isolat dosis I dan II, antara kelompok kontrol positif dengan isolat dosis I dan II. Ada perbedaan yang signifikan persentase viabilitas spermatozoa antara kelompok kontrol negatif dengan perlakuan isolat dosis III dan antara kelompok kontrol positif dengan isolat dosis III

Tidak terdapat perbedaan yang signifikan persentase morfologi spermatozoa normal antara kelompok kontrol positif dengan fraksi etanol 96% biji *M. pruriens* dan isolat berbagai dosis. Ada perbedaan yang signifikan persentase morfologi spermatozoa normal antara kelompok kontrol negatif dengan perlakuan fraksi dosis I sampai dosis III, antara kelompok kontrol negatif tersebut dengan kelompok kontrol positif, dan antara kelompok kontrol negatif dengan isolat berbagai dosis.

Penelitian ini membuktikan bahwa fraksi etanol 96% dapat meningkatkan kecepatan motilitas dan persentase morfologi spermatozoa normal pada mencit yang terpapar 2-ME. Sedangkan isolat biji *Mucuna pruriens* dapat meningkatkan jumlah, kecepatan motilitas, persentase viabilitas spermatozoa, dan persentase morfologi spermatozoa normal pada mencit yang terpapar 2-ME. Saran yang diberikan adalah menaikkan dosis fraksi etanol 96% dan isolat biji *Mucuna pruriens*, lebih tinggi 56 mg/kg.bb/hari untuk fraksi etanol 96% dan lebih tinggi dari dosis 5,6 mg/kg.bb/hari untuk dosis isolat dengan tetap memperhatikan LD_{50} -nya., menaikkan dosis dan lama paparan bahan toksik (2-ME) lebih tinggi dari 100 mg/kg.bb/hari dengan waktu paparan lebih dari 12 hari, dan menaikkan dosis L-dopa standart yang dipakai lebih tinggi dari 1,3 mg/hari, dengan tetap memperhatikan dosis lazim dan LD_{50} L-dopa. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk menyempurnakan hasil penelitian ini.

SUMMARY

**EFFECT OF 96% ETHANOL FRACTION AND ISOLATE
KORO BENGUK (*Mucuna pruriens* L.) SEED ON SPERMATOZOA
QUALITY OF 2-METHOXYETHANOL-EXPOSED MICE (*Mus musculus*)**

Based on previous studies in India, with proper management and processing, the plant *Mucuna pruriens* L. (*Papilionaceae*) in the area known as koro benguk has a high potential. In experimental animals, this plant has been proved to increase sexual activity of normal male white rats as experimental animals. In addition, it is also used as herbal medicine to increase sperm quality, improve semen profile and seminal plasma biochemical parameters, and improve male fertility. These benefits are supported by the substance presence in the plant *Mucuna pruriens*, primarily the content of non protein microelement (-)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine (L-dopa) amino acid. Considering high content of L-dopa, there should be an attempt to use it as herbal medicine for overcoming infertility, such as that in previous studies, in addition to the benefit from production of *tempe benguk*. The fact that infertility rate in the last decades is increasing should also be considered.

Infertility incidence is increasing in the last 40 years. Approximately 10-15% of population are infertile. Aesoph (1998) explains that 10-15% of couples are infertile. It is suggested that male factor is involved in 50% of infertile cases, either as primary problem or as combination with their female partners. There are other suggestions that 40% of the cause of infertility is in the male partner, 40% in female partner, and 30% in both male and female partners. Olsen reported that spermatozoa concentration has decreased 50% in a period of 50 years (1940-1990). Sperm concentration has reduced from 113 million spermatozoa/ml to 66 million spermatozoa/ml. Data on the mean of spermatozoa concentration in infertile groups in one year at Andrology Clinic, Airlangga University Faculty of Medicine, Dr Soetomo Hospital (1993) was 21.1 million/ml.

Factors affecting infertility are, for instance, hormone, infection, radiation, drugs, and chemical substances, either natural or synthetics, that may interact with endocrine system. The success of fertilization process is affected by, among others, spermatozoa quality produced from testis. ESHRE Capri Workshop in 2000 in Royal College of Obstetricians and Gynaecologist (RCOG) stated that sperm analysis is the primary determination of infertility diagnosis, in addition to tube patency, and ovulatory diagnosis. Therefore, efforts to improve spermatozoa quality are needed. It can be attempted with non hormonal method (foods, supplements, lifestyle) and hormones. In terms of spermatozoa quality improvement through non hormonal method, the seed of *Mucuna pruriens* can be employed due to the active ingredient of the seed. The seed of *Mucuna pruriens* is better than synthetic drugs as it is a herbal medicine and also contains other substances possibly beneficial for body. Therefore, well-qualified *Mucuna pruriens* seeds, which is also not containing toxic substances (HCN and pesticide residue) are needed. Based on examination using HPLC, it is found that L-dopa content in 96% ethanol fraction of *Mucuna pruriens* seed was 14.7%, while within isolate it is 56.57%.

The objective of this research was to study the effect of 96% ethanol fraction and isolate *Mucuna pruriens* seed on spermatozoa quality of mice exposed to 2-Methoxyethanol. Mice used in this study were male adult BALB/C strain *Mus musculus*, mated and proved to be fertile. The age of the animals was 8 weeks with 25-30 grams bodyweight. This was an experimental study using complete randomized design. Subjects consisted of 11 groups selected randomly and homogenized. Five groups served as control (negative and positive), 3 groups received subcutaneous injection of 2-ME fraction as much as 100 mg/kg.bw/day for 12 days, followed with 96% ethanol fraction starting from 14 mg/kg.bw/day (P1), 28 mg/kg.bw/day (P2), and 56 mg/kg.bw/day (P3) for 51 days, and the last 3 groups served as isolate treatment group that received subcutaneous injection of 2-ME of 100 mg/kg.bw.day for 12 days, followed with isolate starting from 1.4 mg/kg.bw/days (P4), 2.8 mg/kg.bw/days (P5), and 5.6 mg/kg.bw/days (P6) for 51 days. The final observation was conducted by counting spermatozoa count, motility speed, spermatozoa viability, and percentage of normal spermatozoa morphology.

Result revealed that the administration of 2-ME 100 mg/kg.bw/day for 12 days did not affect sperm count in mice. 2-ME only affected motility speed, spermatozoa viability percentage, and percentage of normal spermatozoa morphology. The median of sperm count in control group was 2.25%, P1 = 5.15%, P2 = 4.82%, P3 = 4.88%, P4 = 5.57%, P5 = 5.13%, and P6 = 6.52%. Mean of spermatozoa motility speed in control group was 4.54 ± 0.61 $\mu\text{m}/\text{second}$, P1 = 7.36 ± 1.05 $\mu\text{m}/\text{second}$, P2 = 7.68 ± 0.86 $\mu\text{m}/\text{second}$, P3 = 8.04 ± 0.96 $\mu\text{m}/\text{second}$, P4 = 8.53 ± 1.17 $\mu\text{m}/\text{second}$, P5 = 9.07 ± 0.75 $\mu\text{m}/\text{second}$, and P6 = 9.31 ± 0.51 $\mu\text{m}/\text{second}$. Median of spermatozoa viability percentage in control group = 81%, P1 = 83.5%, P2 = 84.5%, P3 = 87%, P4 = 85%, P5 = 86%, and P6 = 88%. Median of the percentage of normal spermatozoa morphology in control group = 84.5%, P1 = 94.5%, P2 = 94%, P3 = 95%, P4 = 95.5%, P5 = 95%, and P6 = 96%.

After conducting normality test with one-sample Kolmogorov-smirnov, it was found that all groups and variables had normal distribution ($p > 0.05$). Ratio variable data (motility speed) were tested with one-way Anova, while ordinal variable data (sperm count, viability percentage, and the percentage of normal spermatozoa morphology) were tested using Kruskal-wallis. Comparison test was used one-way Anova test and Kruskal-wallis with significance level of 95%. The result of one-way Anova test was that the motility test had statistically significant difference in various treatment groups ($p < 0.05$), so that it was followed with LSD test.

Using LSD test, it was found that there was no significant difference in motility speed between positive control group (standard L-dopa) with treatment group receiving fractions dose I to dose III and isolate dose I to dose III. No significant difference was found in motility speed between 96% ethanol fraction and isolate treatment groups.

There was significant difference in motility speed between negative control group and fraction and isolate treatment groups in various doses and between negative control and positive control group.

Comparison test used for non-parametric analysis was Kruskal-wallis in significance level of 95%, revealing that the sperm count, the percentage of

viability and the percentage of normal spermatozoa morphology had statistically significant difference in various treatment groups ($p < 0.05$), so it should have to be followed with Mann-whitney test.

The result of Mann-whitney test showed no significant difference in the sperm count between control groups with positive control group and isolate dose I, positive control group with isolate dose I to dose III and between isolate groups. There was significant difference in the sperm count between negative control group with treatment group receiving isolate dose II and III.

The result of Mann-whitney test showed no significant difference in the percentage of spermatozoa viability between control groups with isolate dose I and II, positive control group with isolate dose I and II. There was significant difference in the percentage of spermatozoa viability between negative control group with treatment group receiving isolate dose III and positive control group with isolate dose III.

There was no significant difference in the percentage of normal spermatozoa morphology between positive control group with receiving fractions and isolates in various doses. There was significant difference in the percentage of normal spermatozoa morphology between negative control group with treatment group receiving fraction dose I to dose III, between negative control group with positive control group, and between negative control group with isolates in various doses.

This study proved that 96% ethanol fraction of *Mucuna pruriens* seeds are able to increase motility speed and the percentage of normal spermatozoa morphology in mice exposed to 2-ME while isolate of *Mucuna pruriens* seeds are able to increase sperm count, motility speed, the percentage of spermatozoa viability, and the percentage of normal spermatozoa morphology in mice exposed to 2-ME. The suggestions are as follows: 96% ethanol fraction dose and the isolate of *Mucuna pruriens* seed should be increased more than 56 mg/kg.bw/day for ethanol fraction and more than 5.6 mg/kg.bw/day for isolate dose by still taking into account the LD₅₀, dose and length of exposure of toxic substance (2-ME) should be increased more than 100 mg/kg.bw/day in a longer period of exposure more than 12 days, and standard L-dopse dose should be increased more than 1.3 mg/day by still taking into accoount the usual dose and L-dopa LD₅₀. Further studies should be undertaken to improve the result of this study.