

PENGARUH KEBISINGAN TERHADAP KUANTITAS DAN KUALITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN DEWASA

*THE EFFECT OF NOISE TO QUANTITY AND QUALITY OF SPERMATOZOON OF ADULT MALE WHITE MOUSE (*Rattus norvegicus*)*

Erris^{1*}, Irma Harahap²

¹Staf Pengajar Jurusan Kesehatan Lingkungan Politeknik Kesehatan Jambi

²Staf Pengajar Akademi Keperawatan Jambi

*Korespondensi penulis: nazra_ugm@yahoo.com

Submitted : 24-02-2014; Revised : 15-06-2014; Accepted : 18-08-2014

Abstrak

Salah satu penyebab menurunnya kuantitas dan kualitas spermatozoa adalah stres. Bising sebagai bentuk stres fisik dan psikologis mengaktifkan respon sentral dan perifer sistem endokrin. Aktivasi sistem endokrin sumbu Hipotalamus-Hipofisis-Adrenal melibatkan neurohormon corticotropin releasing hormon (CRH), CRH menuju gonadotrophin releasing hormon (GnRH) dan mengganggu aktivitas kelenjar adenohipofise untuk menghasilkan folicle stimulating hormon (FSH) dan luteinizing hormon (LH), LH dan FSH yang menurun secara umum mengganggu proses spermatogenesis dan khususnya terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa. Penelitian ini adalah eksperimental dengan post test control group design. Variabel yang diperiksa meliputi jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih jantan dewasa (*Rattus norvegicus*), yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, perlakuan berdasarkan perbedaan intensitas bising yaitu 65, 85 dan 105 dB yang diberikan setiap 8 jam/hari selama 48 hari (satu tahap spermatogenesis tikus). Hasil penelitian dianalisis dengan uji ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus putih jantan dewasa (*Rattus norvegicus*) meliputi jumlah, persentase motil dan morfologi spermatozoa. Kesimpulan dalam penelitian ini adalah terlihat kebisingan dengan intensitas 65-105 dB dapat menurunkan kuantitas dan kualitas spermatozoa. Disarankan untuk penelitian lebih lanjut agar dilihat juga pengaruh kebisingan dengan melakukan pemeriksaan histologi pada sel leydig, sel sertoli dan pemeriksaan kadar hormon testosteron.

Kata kunci : kualitas, kuantitas, spermatozoon, tikus putih, kebisingan.

Abstract

One of causes in decreasing quantity and quality of spermatozoon is stress. Noise as the physical and pshycological stress is activating the central response and periphery endocrinal system. Activating the endocrinal system which is axis of Hypothalamus-Pituitary-Adrenal involve neurohormone, corticotropin releasing hormon (CRH). CRH through gonadotrophin releasing hormon (GnRH) and infere with activity of adenohypophyse to produce folicle stimulating hormon (FSH) and luteinizing hormon (LH). LH and FSH decreased commonly disrupt the process of spermatogenesis and especially to the quantity and quality of spermatozoon. This study is experiment with post test control group design. The variable examined include number, motility and morphology. It also use 24 adult white male mice (*Rattus norvegicus*), denaid in to three groups of treatment and 1 group of control. The treatment group is based to the difference of intensity of 65, 85 and 105 dB is being given 8 hours per day for 48 days (one stage of mouse spermatogenesis). The result is analyzed by ANOVA test and further by Post-Hoc-Test (Bonferroni). The result show the significant differences ($p < 0.05$) to quantity and quality of spermatozoon of adult white male mouse (*Rattus norvegicus*). This study showed that the noise by intensity of 65-105 dB can descrease quantity and quality of spermatozoon.

Keywords : quality, quantity, spermatozoon, adult male white mouse, noise.

Pendahuluan

Penyebab utama kesuburan pria adalah kuantitas dan kualitas spermatozoa, yang meliputi

jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa. Salah satu faktor penyebab penurunan kuantitas dan kualitas spermatozoa adalah stres.¹

Penelitian membuktikan bahwa ada hubungan antara stres psikologis dengan kuantitas dan kualitas spermatozoa. Stres psikologis pada tikus menimbulkan hambatan proses pada tingkat hipotalamus dan menyebabkan gangguan hormonal, sehingga mengakibatkan kegagalan sel Leydig mensekresi hormon testosteron.²

Faktor stres lain yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas spermatozoa adalah pekerjaan yang terpapar bising. Penelitian kasus kontrol tentang masalah kesuburan pada pekerja terpapar bising di Denmark menunjukkan stres akibat bising merupakan salah satu faktor yang berhubungan dengan kesuburan pria dan wanita, dimana hal ini disebabkan oleh peningkatan hormonal. Pekerja yang terpapar bising di bidang industri dan konstruksi memiliki faktor risiko terhadap gangguan kesuburan pria.³

Stres bising merupakan bentuk stres fisik dan psikologis yang dapat mengaktifkan respon sentral dan perifer pada sistem endokrin dan syaraf otonom sebagai bentuk adaptasi, sehingga terjadi pengeluaran *corticotropin releasing hormon* (CRH) yang secara sentral, berupa aktivasi sistem endokrin pada sumbu Hipotalamus-Hipofisis-Adrenal (HHA) yang menimbulkan peningkatan sekresi *adenocorticotropin hormone* (ACTH) dan kortisol. Akibat bising terjadi perpanjangan pengeluaran *corticotropin releasing hormon* (CRH) sehingga kadar *corticotropin releasing hormon* (CRH) meningkat, amplitudo dan denyut pengeluaran CRH meningkat melalui pengaktifan secara langsung pada nukleus praventrikuler dan secara tidak langsung pada area preoptik media. Rangsangan neuron CRH pada nukleus praventrikuler hipotalamus mengurangi pengambilan sel *gonadotrophin releasing hormon* (GnRH), sehingga menurunkan frekuensi pulsasi sekresi GnRH.⁴

Peningkatan CRH menimbulkan penurunan GnRH dan produksi *follicle stimulating hormon* (FSH), *luteinizing hormon* (LH) oleh hipofisis. Hormon FSH bekerja pada sel germinal yang berfungsi untuk memulai proliferasi dan differensiasi serta meningkatkan sensitivitas sel Leydig terhadap LH dalam memproduksi testosteron. Karena LH, FSH dan testosteron bekerja sinergis dalam proses spermatogenesis, sehingga jika terjadi penurunan LH, FSH dan testosteron akan mengganggu proses spermatogenesis dan mempengaruhi kualitas spermatozoa.⁵

Penelitian pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) melaporkan bising dengan intensitas yang bervariasi dapat merugikan organ tubuh, bising intensitas 105-120 dB selama dua minggu mengakibatkan peningkatan kadar serum *glutamate oxaloacetat transaminase* (SGOT), serum *glutamate pyruvate transaminase* (SGPT), peningkatan kolesterol dan penurunan trigliserida.⁶ Bising intensitas 100 dB selama 12 hari secara terus menerus mengakibatkan kerusakan ultra struktur dan integritas *deoxy nucleic acid* (DNA) ditandai dengan pembengkakan mitokondria dan lisis matriks miokardium.⁷ Bising intensitas 95 dB mengakibatkan peningkatan sekresi katekolamin melalui urin, asam lemak bebas plasma, berat jenis adrenal dan gangguan pertumbuhan. Bising dengan intensitas 102-114 dB terjadi peningkatan produksi *adenocorticotropin hormone* (ACTH) dan perubahan sekresi hipotalamus.⁸

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh bising dengan intensitas 65 dB, 85dB dan 105 setiap hari selama 48 hari terhadap kuantitas, kualitas dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan dewasa (*Rattus norvegicus*).

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, menggunakan hewan coba dengan desain *post test control group design*. Sampel adalah tikus putih jantan dewasa (*Rattus norvegicus*) berumur 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gr. Tikus dibagi dalam empat kelompok (1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan), dan tiap-tiap kelompok terdiri atas 6 ekor tikus.

Penentuan jumlah sampel didasarkan atas rumus *Abo crombi* dalam : $(t-1)(n-1) \geq 15$. Dimana t = Jumlah kelompok. n = jumlah hewan coba tiap kelompok yaitu : $(4-1)(n-1) \geq 15$. $3n \geq 15+3$; $3n \geq 18/3 = 6$; $n \geq 6$.⁹ Dengan mempertimbangkan *drop out* sebesar 10-20 %, maka didapatkan jumlah seluruh sampel sebanyak 28 ekor, dimana dari 28 ekor tikus terdapat 4 ekor sebagai pertimbangan *drop out* nya, yaitu apabila terjadi sesuatu misalnya kematian pada sampel terutama saat proses adaptasi dan perlakuan.

Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas Padang pada Tahun 2010. Sedangkan prosedur kerja dan teknik pengambilan data yang dilakukan meliputi:

1. Tahap persiapan:

- a. Tikus putih jantan dewasa yang memenuhi kriteria (baik umur maupun berat badan) disiapkan sebanyak 28 ekor (24 ekor sebagai sampel dan 4 ekor sebagai bahan pertimbangan *drop out*).
- b. Melakukan adaptasi lingkungan selama 1 minggu untuk penyesuaian terhadap lingkungan dengan diberi makan yaitu pakan dan minum tikus biasa.
- c. Pengelompokan tikus (3 kelompok perlakuan dan 1 kontrol dimana masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus).

2. Tahap pelaksanaan :

- a. Memberikan perlakuan bising dengan cara memasukkan masing-masing kelompok perlakuan kedalam kamar atau ruang kedap suara yang telah dimodifikasi, dimana masing-masing kamar atau ruang berukuran 1,5x1 m yang dirancang khusus dan terbuat dari bahan kedap suara serta mengalirkan sumber bising dengan menggunakan *sound system* dengan intensitas bising masing-masing 65 dB, 85 dB dan 105 dB setiap 8 jam/hari selama 48 hari (selama satu tahap spermatogenesis tikus).
- b. Perlakuan diberikan sama untuk tiap kelompok, dimana masing-masing kelompok setiap harinya diberi perlakuan bising mulai jam 07.00 – 15.00 Wib
- c. Setelah hari ke-48 tikus disiapkan untuk dilakukan pematihan batang otak, kemudian dilaparotomi dan selanjutnya dilakukan pemotongan terhadap vas deferens masing-masing sepanjang 2cm.
- d. Selanjutnya dilakukan pengambilan spermatozoa vas deferens dengan cara memijat vas deferens yang telah dipotong dan kemudian ditampung dengan menggunakan gelas arloji yang berisi larutan NaCl 0,9%.
- e. Menghitung Jumlah Spermatozoa
Sperma yang telah diaduk homogen dihisap dengan pipet eritrosit sebanyak 0,5 ml, selanjutnya ditambahkan larutan *George* 0,5 ml, setelah diaduk rata, selanjutnya diteteskan diatas kotak kamar hitung *improved newbauer*, kemudian dilihat dibawah mikroskop dan dihitung menggunakan *stopwatch*

jumlah spermatozoa pada 32 kotak besar yang terdapat pada *improved newbauer*. Selanjutnya teteskan sperma yang dicampur larutan fisiologis (NaCl 0,9%), kemudian dihitung jumlah spermatozoa yang mati, setelah kedua hasil didapat maka dihitung jumlah spermatozoa yang mati oleh larutan *Goerge* dikurang jumlah spermatozoa yang mati oleh larutan NaCl, setelah didapat hasilnya maka didapat jumlah motil spermatozoa, setelah itu dikalikan dengan 1 juta yang biasa digunakan untuk satuan jumlah spermatozoa yaitu juta/ml.

Dengan kriteria sebagai berikut :

- Normal : jika jumlah spermatozoa ≥ 20 juta /ml
- *Suspect* : jika jumlah spermatozoa 10-20 juta/ml
- Abnormal : jika jumlah spermatozoa < 10 juta/ml

f. Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa (Persentase Motil)

Pemeriksaan dapat dilakukan sejalan dengan pemeriksaan jumlah total spermatozoa. Adapun motilitas spermatozoa yang diperiksa dalam penelitian ini adalah persentase motil spermatozoa. Setelah didapat jumlah spermatozoa motil (bergerak) dalam mencari jumlah total diatas, kemudian dibagi dengan jumlah yang mati oleh larutan *Goerge*. Selanjutnya hasilnya dikalikan 100 (%).

- Normal : Motilitas baik $\geq 50\%$
- Suspect* : Motilitas baik 40-50%
- Abnormal : Motilitas baik $< 40\%$

g. Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa

Dilakukan dengan cara membuat preparat apusan sperma dengan pewarnaan menggunakan larutan *Giemsa* kira-kira 5 menit, setelah apusan tersebut kering kemudian dilihat dibawah mikroskop, selanjutnya lihat perlapangan pandang bentuk normal dari pengambilan per 100 spermatozoa secara acak. Selanjutnya dari 100 spermatozoa tersebut dihitung jumlah yang mempunyai morfologi normal, selanjutnya dikali 100 (%). Pemeriksaan morfologi mencakup kelengkapan bagian kepala dan ekor spermatozoa.

Kriteria

- Normal : Morfologi normal $\geq 50\%$
- Suspect* : Morfologi normal 40-50%
- Abnormal : Morfologi normal $< 40\%$

Hasil

Tabel 1. Jumlah Spermatozoa Setelah Perlakuan Bising

Pengulangan	Jumlah Spermatozoa (Juta/ml)			
	Kontrol	Perlakuan Bising		
		I (65 dB)	II (85 dB)	III (105 dB)
1	54	42	36	20
2	56	44	30	26
3	42	44	30	18
4	53	48	34	29
5	54	40	38	20
6	54	42	31	22
Jumlah	313	260	199	135
Rerata	52,17	43,33	33,17	22,50

Tabel 2. Persentase Motil Spermatozoa Setelah Perlakuan Bising

Pengulangan	Persentase Motil Spermatozoa (%)			
	Kontrol	Kelompok Perlakuan Bising		
		I (65 dB)	II (85 dB)	III (105 dB)
1	59	45	35	31
2	61	53	31	9
3	51	43	20	17
4	49	42	34	22
5	48	43	31	16
6	50	49	39	20
Jumlah	318	275	190	115
Rerata	53	45,83	31,67	19,17

Tabel 3. Morfologi Abnormal Spermatozoa Setelah Perlakuan Bising

Pengulangan	Morfologi Abnormal Spermatozoa (%)			
	Kontrol	Kelompok Perlakuan Bising		
		I (65 dB)	II (85 dB)	III (105 dB)
1	35	80	64	85
2	40	65	60	78
3	26	61	73	89
4	30	70	88	93
5	29	82	82	85
6	40	70	80	80
Jumlah	208	428	447	510
Rerata	33,33	71,33	74,50	85,00

Tabel 1 menyajikan rata-rata jumlah spermatozoa berbeda antara kelompok kontrol dan perlakuan. Ada kecenderungan penurunan rata-rata jumlah spermatozoa mulai dari kontrol dan perlakuan. Uji normalitas diperoleh nilai $p > 0,05$ (terdistribusi normal), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji parametrik *ANOVA*.

Berdasarkan tabel 2 diperoleh rata-rata persentase motil spermatozoa berbeda antara kontrol dengan beberapa perlakuan. Ada

kecenderungan penurunan rata-rata persentase motil spermatozoa mulai dari kelompok kontrol dan perlakuan. Uji normalitas diperoleh nilai $p > 0,05$ yang berarti data tersebut terdistribusi normal, dan dilanjutkan dengan uji parametrik *ANOVA*.

Berdasarkan tabel 3 terlihat rata-rata morfologi abnormal spermatozoa berbeda antara kelompok kontrol dengan perlakuan. Ada kecenderungan peningkatan rata-rata morfologi

Tabel 4. Hasil Uji ANOVA terhadap Jumlah, Persentase Motil dan Morfologi Abnormal Spermatozoa Setelah Perlakuan Bising

Kelompok	Rerata			SD			Kemaknaan		
	Jumlah	% Motil	Morfologi	Jumlah	% Motil	Morfologi	Jumlah	% Motil	Morfologi
Kontrol	52,17	53,00	33,33	5,07	5,07	5,92	0,000	0,000	0,000
I	43,33	45,83	71,33	2,73	2,73	8,23			
II	33,17	31,67	74,50	3,37	3,37	10,87			
III	22,50	19,17	85,00	4,18	4,18	5,55			

abnormal spermatozoa mulai dari kontrol dan perlakuan. Uji normalitas diperoleh nilai $p > 0,005$ yang berarti data tersebut terdistribusi normal, sehingga dapat dilanjutkan uji parametrik ANOVA.

Dari hasil uji ANOVA didapatkan ada perbedaan yang bermakna antara rata-rata jumlah, persentase motil dan morfologi abnormal spermatozoa antara kontrol dan perlakuan.

Pembahasan

Jumlah Spermatozoa Akibat Perlakuan Bising

Jumlah spermatozoa yang dihasilkan tergantung pada proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferus. Bila spermatogenesis berlangsung normal maka akan dihasilkan jumlah spermatozoa yang normal juga. Sebaliknya jika selama proses spermatogenesis terjadi gangguan, maka perkembangan sel spermatogonium terganggu dan akan mempengaruhi jumlah spermatozoa yang terbentuk. Hal ini sangat tergantung pada besarnya gangguan yang terjadi selama proses spermatogenesis.

Penurunan jumlah spermatozoa setelah perlakuan bising diduga karena efek stres yang ditimbulkan oleh bising, sehingga mengaktivasi sistem endokrin pada poros hipotalamus-hipofisis-adrenal (HPA), akibatnya terjadi gangguan pengeluaran neurohormon CRH berupa penurunan jumlah sel spermatogonium. Hal tersebut terjadi akibat menurunnya sekresi LH, FSH dan testosteron. Kekurangan LH, FSH dan testosteron secara langsung akan menghambat proses proliferasi spermatogonium dan akhirnya akan mengganggu proses spermatogenesis. Spermatogenesis adalah merupakan suatu rangkaian proses yang meliputi proses proliferasi, diferensiasi dan pematangan sel-sel spermatogenik. Oleh karena itu apabila terjadi hambatan pada suatu tahap maka akan mempengaruhi perkembangan proses berikutnya.

Adapun CRH dapat bekerja langsung pada neuron GnRH dengan cara menurunkan jumlah spermatozoa.⁸

Jumlah spermatozoa yang dihasilkan oleh testis tidak cukup untuk mendiagnosa infertil atau tidaknya seseorang, begitu juga pada hewan coba tikus. Karena ada kalanya jumlah sperma yang normal tetapi bila memiliki morfologi dan motilitas yang tidak baik akan menyebabkan infertil. Sebaliknya dengan jumlah sperma yang sedikit tapi memiliki morfologi dan motilitas normal maka masih dapat dikatakan fertil.⁹

Motilitas Spermatozoa (Persentase Motil) Akibat Perlakuan Bising

Gerakan spermatozoa dipengaruhi oleh flagel yang bergerak longitudinal secara ritme diantara tubulus posterior dan anterior spermatozoa yang membentuk aksonema.⁹ Spermatozoa yang normal pada manusia bergerak lurus dan dipengaruhi oleh suhu, dan pH. Suhu yang tinggi akan meningkatkan gerak sperma. Perbaikan integritas membran plasma dan peningkatan kadar energi intrasel meningkatkan gerakan spermatozoa.¹²

Banyak faktor yang mempengaruhi persentase motil, diantaranya adalah lama waktu di epididimis, morfologi, fisiologi, biokimia spermatozoa, flagella, aglutinasi, antibodi, kekentalan, pH, temperatur, cairan atau sekret dan imunologi. Gangguan pematangan spermatozoa di epididimis terjadi pada proses glikolisis sebagai sumber energi. Metabolisme oksidatif pada spermatozoa dengan substrat testosteron dapat menghasilkan energi untuk bergerak. Penurunan energi tersebut akan menyebabkan gerak spermatozoa menjadi lambat atau tidak bergerak sama sekali. Perbaikan integritas membran plasma dan peningkatan kadar energi intrasel meningkatkan gerak spermatozoa.¹¹

Bising termasuk salah satu stres fisik dan psikologis, sehingga ada hubungan antara stres psikologis dengan penurunan fungsi reproduksi

pria, salah satunya menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa, dalam hal ini adalah persentase motil spermatozoa.¹

Morfologi Abnormal Spermatozoa Akibat Perlakuan Bising

Bentuk spermatozoa abnormal dapat meningkat, terjadi karena berbagai gangguan terutama dalam proses spermatogenesis, terutama pada tahap spermiogenesis. Gangguan ini bisa disebabkan oleh hormonal, radikal bebas dan bahan kimia.¹⁴ Perubahan bentuk spermatozoa tersebut disebabkan karena penurunan testosteron. Secara fungsional epididimis tergantung pada testosteron dalam proses perubahan tersebut, sehingga jika kadar testosteron menurun akan menyebabkan terjadinya morfologi spermatozoa yang abnormal.¹¹ Dalam epididimis spermatozoa mengalami serangkaian perubahan morfologi dan fungsional seperti ukuran, bentuk, ultrastruktur.¹³

Kesimpulan

Bising dengan intensitas 65 dB, 85 dB dan 105 dB berpengaruh terhadap penurunan jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan dewasa (*Rattus norvegicus*). Semakin tinggi tingkat intensitas bising yang diberikan maka semakin menurun kuantitas dan kualitas spermatozoa.

Saran

Disarankan untuk dapat mengurangi dampak kebisingan ini pekerja dapat menggunakan pelindung telinga selama bekerja dan adanya penelitian lebih lanjut agar dilihat juga pengaruh kebisingan dengan melakukan pemeriksaan histologi pada sel leydig, sel sertoli dan pemeriksaan kadar hormon testosteron.

Daftar Pustaka

1. Clarke RN, Klock SC, Geoghegan A, Trabassos D. Relationship between psychological stress and semen quality among in-vitro fertilization patients. *fertil steril*. 1998. p.19-26.
2. Matthew PH, Chantel MS, Renshan G, Christina R, Mc Kittrick, Kellie L, et al. Trends of reproductive hormones in male rats during

- psychosocial stress : role of glucocorticoid metabolism in behavioral dominance. *biology of reproduction*. 2002. p.1750-55.
3. Oedono TRM. Trauma bising kajian terhadap faktor resiko internal dengan pendengaran serta upaya pencegahan dengan cara pengobatan menggunakan kombinasi vitamin A dan E. Disertasi. UGM. 1998
4. Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. A conceptual model of the influence of stress on female reproductions. 2003. p.151-63.
5. Selvage DJ, dan Rivier C. Importance of paraventricular nucleus of the hypothalamus as a competent neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. *Journal of Endocrinology*. 2003;594-8.
6. Gehlot A, Godhwani S, Aseri ML, Jain P, Vyas MCR. Sound stress induce changes and their modification by drugs in albino rats; and experimental study. *Indian Journal of Pharmacology*. 1997;187.
7. Paola L, Frenzilli G, Gesi M, Ferruci M, Lazzeri G, Nigro FFM. DNA damage associated with ultrastructural alterations in rat myocardium after loud noise exposure: Environment health perspective. 2003. p.467-71.
8. Mancini KM, Gladwin DN, Vilella R, Cavendish MG. Effect of aircraft noise and sonic booms on domestic animals and wildlife : A Literature Synthesis, U.S Fish and Wildlife Service, National Ecology Research Center, Fort Collins, USA. 1998.
9. Hanafiah. Rancangan percobaan teori dan aplikasi. Palembang: Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya. 1997.
10. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Science*. 1998;311-35.
11. Guyton AC and Hall. Textbook of medical physiology. Philadelphia Pennsylvania: WB Saunders Company. 9th edition. 2000.
12. Rangari K. A study on testosterone dependent molecular and biomedicine, national institute of health and family welfare. New Delhi, India. 2003.
13. Hafez E. Reproduction in Farm Animal. Philadelphia: Lea & Febiger. 2000. p.203-6
14. Wildan Y. Reproduksi dan embriologi. Bandung: Tarsito. 1996.