



BioLink

JURNAL BIOLOGI LINGKUNGAN, INDUSTRI, KESEHATAN

Available online <http://ojs.uma.ac.id/index.php/biolink>

KUALITAS SPERMATOZOA DAN INDEKS FERTILITAS TIKUS PUTIH DEWASA (*Rattus novvergicus* L.) SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN WUNGU (*Graptophyllum pictum*. L.Griff)

QUALITY OF SPERMATOZOA AND FERTILITY INDEX OF ADULT WHITE RAT (*Rattus novvergicus* L.) AFTER GIVING OF WUNGU LEAVES EXTRACT (*Graptophyllum pictum*. L.Griff)

Hendro Pranoto*

Pogram Studi Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan

*Corresponding author: E-mail: hendro.p.unimed@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun wungu (*Graptophyllum pictum* L. Griff) terhadap indeks fertilitas dan spermatozoa morfologi normal pada tikus jantan (*Rattus novvergicus*.L). Lima belas ekor tikus jantan dan 45 ekor tikus betina berumur 9 – 10 minggu digunakan sebagai sampel penelitian. Lima belas ekor tikus jantan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dosis ekstrak daun wungu yaitu kontrol I (0mg/KgBB), kontrol II (0,5ml minyak zaitun), dosis 1 (100mg/KgBB), dosis 2 (200mg/KgBB), dan dosis 3 (400mg/KgBB) selama 60 hari. Perlakuan diberikan secara oral dan masing- masing kelompok terdiri atas tiga hewan uji sebagai ulangan Pada hari ke-55 sampai hari ke-60, masing- masing hewan uji dikawinkan dengan perbandingan satu jantan dikawinkan dengan tiga betina. Setelah 60 hari dilakukan pengamatan terhadap 15 ekor tikus jantan dan 45 ekor tikus betina untuk mengetahui kebuntingan (indeks fertilitas). Data yang diperoleh diuji dengan Analysis of Variance Test (ANOVA $\alpha = 0,05$) dan Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Berdasarkan pengamatan dan analisis statistik didapatkan hasil bahwa perlakuan dengan ekstrak daun wungu dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh nyata terhadap indeks fertilitas namun menunjukkan pengaruh nyata terhadap parameter spermatozoa morfologi normal. Hal ini terlihat jelas dengan semakin besar dosis yang diberikan maka terjadi penurunan spermatozoa morfologi normal. Berdasarkan analisis regresi linier terdapat korelasi nyata antara variasi dosis ekstrak daun wungu, indeks fertilitas dan jumlah normal spermatozoa.

Kata kunci: Tikus Putih, Daun Wungu, Indeks fertilitas, Kualitas spermatozoa

Abstract

This research objective is to identify the effects of wungu leaf extract (*Graptophyllum pictum* L. Griff) on the fertility index and spermatozoa of normal morphology in male rat (*Rattus novvergicus*.L). Fifteen male and 45 female rats of 9 to 10 weeks old were used as research samples. The fifteen male rats were divided into five treatment groups of wungu extract dosage: control I (0mg/KgBW), control II (0.5ml olive oil), dosage 1 (100mg/KgBW), dosage 2 (200mg/KgBW), and dosage 3 (400mg/KgBW) for 60 days. The extract was given orally and each group consisted of three test rats as repetition. On the day 55 to day 60, each test male animal was mated with three female rats. After 60 days, an observation was done to 15 male and 45 female rats to identify fertility index. Normal spermatozoa morphological observation with microscope. The data obtained were tested by Analysis of Variance Test (ANOVA $\alpha = 0.05$) and Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Based on the observation and statistical analysis, it was found that wungu leaf extract of different dosages did not give significant effects on fertility index but have significant effects on spermatozoa of normal morphology. This was proven by the fact that the higher the dosage given, the worse the spermatozoa of normal morphology. Based on Linear Regression Analysis, it was found significant correlation between dosage variation extract of wungu leaf and fertility index, and number of normal spermatozoa..

Keywords: White rat, Wungu leaves, Fertility index, Spermatozoa quality

How to Cite: Pranoto, H, 2018, Kualitas Spermatozoa dan Indeks Fertilitas Tikus Putih Dewasa (*Rattus novvergicus* L.) Setelah Pemberian Ekstra Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* L. Griff), *BioLink*, Vol. 4 (2): Hal. 162-169

PENDAHULUAN

Penggunaan obat antifertilitas bertujuan untuk mengurangi kesuburan dengan cara mencegah pertemuan antara sel spermatozoa dan sel telur. Pengendalian kesuburan pada dasarnya merupakan usaha untuk mencegah kehamilan. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan seperti penggunaan kondom, spermisida/pil vagina dan sistem berkala (Kemenkes, 2003).

Pengendalian kesuburan tidak hanya dapat dilakukan pada wanita, pria juga dapat terlibat aktif. Keikutsertaan pria secara aktif dalam melaksanakan program KB hanya 5,6% dari seluruh peserta program (Gufon *et al*, 1989). Pada prinsipnya, pria dapat mengendalikan kesuburan dengan cara mengupayakan agar spermatozoa tidak fungsional, tidak bertemu ovum, tidak dikeluarkan dan tidak menghasilkan spermatozoa (Arsyad dan Soehadi, 1982).

. Untuk meningkatkan partisipasi pria dalam program keluarga berencana perlu dicarikan alternatif bahan kontrasepsi. Upaya untuk mencari bahan atau obat kontrasepsi dengan memanfaatkan bahan dari tumbuhan dan hewan telah banyak dilakukan oleh para ahli, tetapi belum dilakukan secara intensif dan hasilnya masih belum memuaskan. Oleh karena itu, eksplorasi dan penelitian obat kontrasepsi yang berasal dari tumbuhan masih merupakan skala prioritas. Selain itu bahan obat-obatan kontrasepsi yang berasal dari tumbuhan memiliki berbagai keuntungan antara lain toksisitasnya rendah, mudah diperoleh, harga murah dan kurang menimbulkan efek samping (Tadjudin, 1984).

Fransworth *et al.* (1975) mengelompokkan berbagai tumbuhan yang diketahui mempunyai potensi sebagai bahan pengatur fertilitas. Kelompok tumbuhan tersebut ada yang mengandung senyawa dari golongan steroid, alkaloid dan triterpenoid. Menurut Kemenkes (1993), pengaruh yang ditimbulkan antara lain, mencegah terjadinya ovulasi, mengganggu oogenesis dan spermatogenesis, meningkatkan persentase kehilangan gestasi dan mereduksi jumlah anak sekelahiran ((Sabri, 2007).

Salah satu tumbuhan tropis yang mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai bahan pengaturan fertilitas adalah senyawa yang terdapat pada daun wungu karena berdasarkan hasil penelitian Kusumawati (2002) bahwa daun wungu memiliki kandungan senyawa flavonoid, saponin, steroid dan triterpenoid.

Ekstrak daun wungu memiliki efek estrogenik pada uterus mencit betina ovariektomi yaitu terjadi peningkatan diameter, tebal lapisan mukosa, panjang sel epitel rongga dan kelenjar (Suhargo, 2005).

Estrogen secara normal didapatkan pada darah mamalia jantan dewasa dalam kadar yang sangat rendah (Ganong, 1993). Kadar estrogen didalam darah yang cukup tinggi dapat menghambat sekresi LH (*Luteinizing Hormone*) dan atau FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) (Gorban dan Bern, 1974). LH dan FSH sangat penting untuk megontrol proses seluler pada manusia yang meliputi ; proliferasi dan diferensiasi sel germinal, sintesis dan sekresi testosteron serta maturasi spermatozoa. Jika terjadi gangguan pada sekresi testosteron, maka dapat

menurunkan aktivitas seksual (Toelihere, 2006).

Berdasarkan hasil pemikiran tersebut maka dilakukan uji laboratorium apakah ekstrak tanaman wungu dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa serta fertilitas jantan pada tikus putih (*Rattus novergicus .L*) saat pemberian ekstrak daun wungu.

METODE PENELITIAN

Bahan ekstrak adalah tanaman wungu, bagian yang digunakan adalah daunnya. Proses ekstraksi daun wungu menggunakan pelarut benzena 70% sebanyak 300 ml dengan metode sohxlet. Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan dewasa dari jenis *Rattus novergicus L* usia 9 – 10 minggu sebanyak 15 ekor dan tikus betina dewasa belum pernah kawin sebanyak 45 ekor. Pembuatan preparat histologi spermatozoa menggunakan Giemsa 3%.

Ekstrak daun wungu diberikan per oral, dengan spuit injeksi yang ujungnya sudah diganti dengan kanul, selama 60 hari. Dosis masing-masing adalah sebagai berikut : akuades, 0,5 ml minyak zaitun, 100 mg/kgBB/hari, 200 mg/kgBB/hari dan 400 mg/kgBB/hari (Kusumawati, 2002). Pada hari ke-55 sampai hari ke-60, tikus jantan dipisahkan dan dikawinkan dengan tikus betina. Setiap ekor tikus jantan dikawinkan dengan 3 ekor tikus betina. Kemudian tikus betina diperiksa untuk mengetahui adanya sumbat vagina (*vaginal plug*) dan melihat adanya

sperma pada apusan vagina, maka hari itu ditetapkan sebagai hari ke-0 kebuntingan (Manson dan Kang, 1989). Indeks fertilitas jantan dihitung menggunakan rumus menurut Anderson dan Conning (1996).

Data jumlah spermatozoa dengan morfologi abnormal dan normal diperoleh dari hasil pengamatan 100 buah spermatozoa.

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur, dilakukan pengujian dengan *Analysis of Variance* (Anova, $\alpha = 0,05$). Apabila terdapat perbedaan yang nyata maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple range Test* (DMRT, $\alpha = 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan kemampuan reproduksi individu jantan dilakukan dengan mengamati mutu spermatozoa, berat organ reproduksi, dan mengamati hasil uji kawin yang ditunjukkan pada hewan betina pasangannya (Thomas, 1991). Testis merupakan organ yang penting dalam proses spermatogenesis karena didalamnya terdapat tubulus seminiferus yang menjadi tempat terbentuknya sperma. Hasil penimbangan berat testis ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata berat testis tikus jantan antar perlakuan ekstrak daun wungu

No	Dosis (mg/kgBB/hari)	Rerata berat testis (mg)
1	Kontrol	1,12±0,10 ^a
2	Minyak zaitun	1,21±0,18 ^a
3	100	1,05±0,09 ^a
4	200	1,00±0,09 ^a
5	400	0,89±0,22 ^a

Ket : huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata (p<0,05)

Tabel 1 memperlihatkan bahwa rerata berat testis pada kelompok kontrol tertinggi dan terendah pada kelompok perlakuan ekstrak daun wungu dengan dosis 400mg/KgBB, namun hasil uji statistik dengan ANOVA membuktikan tidak terdapat perbedaan bermakna dari rerata berat testis pada kelima kelompok. Hasil ini mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak daun wungu tidak berpengaruh nyata terhadap rerata berat testis tetapi terjadi penurunan berturut-turut pada setiap peningkatan dosis yang diberikan.

Testis tersusun oleh tubulus seminiferus dan jaringan interstisial yang ditempati oleh sel Leydig. Tubulus seminiferus ditempati oleh sel germinal dengan tingkat perkembangan mulai dari spermatogonium sampai dengan spermatozoa dan sel sertoli yang berperan sebagai penunjang, pelindung

dan pengatur nutrisi untuk sel germinal yang sedang berkembang. Jaringan interstisial merupakan celah diantara tubulus seminiferus yang didalamnya terdapat jaringan ikat, saraf, pembuluh darah, limfe serta sel Leydig (Junquera et al., 1998).

Analisis morfometrik pada testis *Rattus norvegicus* normal yang dilakukan oleh Mori dan Christensen (1980) menunjukkan bahwa komposisi penyusun testis terbesar adalah tubulus seminiferus (82,4%), sedangkan sel Leydig menempati 2,7% dari total volume testis. Namun begitu, pemberian ekstrak daun wungu dengan dosis 100mg/KgBB, 200mg/KgBB dan 400mg/KgBB tidak menimbulkan penurunan berat testis yang berarti. Berikut ini merupakan rerata indeks fertilitas jantan dari hasil perkawinan yaitu :

Tabel 2. Rerata indeks fertilitas tikus jantan antar perlakuan ekstrak daun wungu

No	Dosis (mg/kgBB/hari)	Rerata indeks fertilitas (%)
1	Kontrol	100±0,00 ^a
2	Minyak zaitun	100±0,00 ^a
3	100	88,89±0,58 ^a
4	200	77,78±1,00 ^a
5	400	55,56±0,58 ^a

Ket : huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata (p<0,05)

Uji statistik dengan ANOVA menunjukkan tidak terdapat perbedaan indeks fertilitas jantan secara bermakna pada kelima kelompok. Meskipun

demikian, terlihat penurunan indeks fertilitas jantan secara berturut-turut pada kelompok perlakuan dosis 100mg, 200mg dan 400mg jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Hasil ini

mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak daun wungu dengan dosis 100mg, 200mg dan 400mg belum cukup menurunkan indeks fertilitas jantan secara bermakna, tetapi data yang menunjukkan bahwa semakin tinggi

dosis yang diberikan maka semakin menurunkan indeks fertilitas jantan. Data rerata jumlah spermatozoa normal pada tikus jantan di sajikan pada tabel 3 sebagai berikut :

Tabel 3. Rerata jumlah spermatozoa normal pada tikus jantan antar perlakuan ekstrak daun wungu

No	Dosis (mg/kgBB/hari)	Rerata jumlah spermatozoa normal (%)
1	Kontrol	100±0,00 ^a
2	Minyak zaitun	100±0,00 ^a
3	100	94,67±1,53 ^c
4	200	92,33±1,53 ^d
5	400	91,33±1,53 ^e

Ket : huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan pengamatan terhadap bentuk spermatozoa yang tercantum pada tabel 3 menunjukkan bahwa jumlah rata-rata bentuk spermatozoa yang normal terdapat perbedaan bermakna antara kontrol , dosis 100mg/KgBB, 200mg/KgBB dan 400mg/KgBB berdasarkan nilai $F_{hitung} = 36,667 > F_{tabel} = 3,48$. Dilanjutkan dengan uji DMRT untuk mengetahui perbedaan bermakna antara kelima perlakuan menunjukkan bahwa jumlah spermatozoa normal semakin menurun dengan semakin meningkatnya pemberian dosis ekstrak daun wungu. Jumlah spermatozoa normal turun pada kelompok perlakuan dosis 100 mg/KgBB (94,67±1,53), 200 mg/KgBB (92,33±1,53), 400 mg/KgBB (91,33±1,53) dibandingkan dengan kelompok KI (100±0,00) dan KII (100±0,00).

Abnormalitas spermatozoa yang ditemukan dalam penelitian adalah

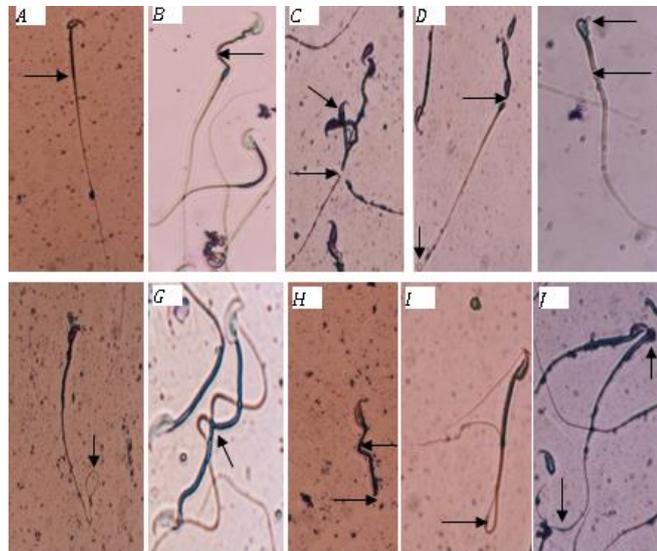
abnormalitas kepala, bagian tengah dan bagian ekor (Gambar 1). Abnormalitas kepala meliputi kepala ganda dan kepala tanpa akrosom. Abnormalitas bagian tengah meliputi bagian tengah bersatu, bagian tengah terputus dan bagian tengah berbentuk sudut. Abnormalitas bagian ekor meliputi ekor terputus, ekor melingkar, aglutinasi pada bagian ekor dan ekor melengkung. Bentuk spermatozoa abnormal dibedakan menjadi abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer terjadi selama perkembangan spermatozoa dalam tubulus seminiferus testis yang biasanya terjadi pada daerah kepala (Partodiharjo, 1980) dan abnormalitas sekunder terjadi selama proses pematangan spermatozoa dalam epididimis sampai meninggalkan testis (Laing, 1979). Perubahan bentuk spermatozoa dapat disebabkan karena penurunan testotesterone sehingga menghambat pembentukan protein a-

tubulin sebagai komponen dasar mikrotubuli dan mikrofilamen yang penting dalam proses spermiogenesis untuk menggerakkan sitoplasma kearah belakang menuju flagel (Zaneveld dan Chatterton, 1982).

Dalam epididimis, terjadi serangkaian perubahan ukuran, bentuk, ultrastruktur, bagian tengah, DNA, pola metabolisme dan sifat membran plasma (Hafez, 1987). Secara fungsional, epididimis tergantung pada testosteron dalam proses perubahan tersebut, sehingga jika kadarnya menurun

menyebabkan pembentukan sperma abnormal (Guyton, 2000).

Berdasarkan hasil penelitian periode perlakuan dengan ekstrak daun wungu terjadi penurunan jumlah spermatozoa normal dan meningkatkan spermatozoa abnormal. Adanya gangguan morfologi spermatozoa didalam *tubulus seminiferus* diduga disebabkan ekstrak daun wungu menimbulkan gangguan pada fungsi spermiogenesis menyebabkan terganggunya peran sel *Leydig* dalam biosintesis testosteron.



Gambar 1 : Berbagai kelainan morfologi spermatozoa *Rattus norvegicus.L* setelah diberi ekstrak daun wungu

Keterangan : A) normal, B) bagian tengah berbentuk sudut, C) kepala ganda, bagian tengah bersatu, ekor terputus, D) bagian tengah terputus, ekor melingkar, E) kepala tanpa akrosom, bagian tengah terputus, F) ujung ekor melingkar, G) aglutinasi pada bagian ekor, H) ekor terputus, bagian tengah berbentuk sudut, I) ekor melipat, J) ekor melengkung dan kepala tanpa akrosom. Pewarnaan : Giemsa 3% dan perbesaran : 400x

Menurut Hadley (1992), testosteron dapat memacu spermatogenesis serta mempertahankan struktur dan fungsi sistim reproduksi. Apabila produksi testosteron menurun, ada kemungkinan terjadi gangguan spermatogenesis sehingga terjadi abnormalitas morfologi spermatozoa pada fase spermiogenesis. Bila proses spermiogenesis terganggu

ada kemungkinan ditemukannya spermatozoa abnormal dengan cara menghambat protein α - tubulin pada spermatid (Arsyad, 1999). Penurunan kadar hormon testosteron kemungkinan menimbulkan gangguan dalam *epididymis* sehingga ditemukan spermatozoa abnormal, seperti ekor patah, ekor terpisah dari kepala kemungkinan lain juga disebabkan oleh

gangguan kontraksi otot polos pada *cauda epididymis* dan gangguan absorpsi cairan oleh *epitelium cauda epididymis*. Menurut Toelihere (1985), abnormalitas sekunder terjadi setelah spermatozoa meninggalkan *tubulus seminiferus*, selama perjalanan melalui *epididymis* dan *vas deferens*, selama ejakulasi dan selama perjalanan melalui *urethra*. Menurut Lu (1995), suatu toksik dapat menurunkan jumlah sel-sel spermatogenik dan menyebabkan abnormalitas spermatozoa yang merupakan hasil akhir dari spermiogenesis, sehingga apabila hasil ini dihambat atau dipengaruhi oleh zat, maka spermatozoa yang dihasilkan juga mengalami gangguan yang dapat dilihat sebagai abnormalitas.

Diduga senyawa aktif ekstrak daun wungu menghambat proses steroidogenesis sehingga pembentukan testosteron akan menurun. Penurunan kadar testosteron akan mengganggu proses spermatogenesis dalam epididymis sehingga terjadi perubahan bentuk sperma dan mengganggu proses glikolisis sebagai sumber energi gerakan sperma (Hafez, 1987). Toelihere (1981) menegaskan bahwa spermatozoa tidak normal terjadi akibat kelainan *tubulus seminiferus*, spermatozoa mengandung kromosom diploid, pengocokan semen yang berlebihan, pembuatan sediaan apus yang tidak sesuai, terlalu lama disimpan, spermatozoa tercampur air seni. Kadang-kadang tidak ditemukan penyebab pasti mengapa terdapat spermatozoa abnormal dan kelainan tersebut dapat menjadi normal kembali dengan berlalunya waktu (Nalbandov, 1976).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun wungu dengan berbagai variasi dosis selama 60 hari pada tikus jantan dewasa mampu menurunkan berat testis, indeks fertilitas jantan meskipun tidak signifikan dan menyebabkan abnormalitas morfologi spermatozoa secara signifikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D. dan D.M. Conning. 1996. *Experimental Toxicology The Basic Issues*, 2th ed., Atheneaeum Press Ltd, Cambridge, pp.396-397.
- Arsyad, K.M. 1999. *Biologi Kedokteran dan Kesehatan Manusia. Peran Andrologi Untuk Kesehatan Reproduksi Pria dan Kebahagiaan Keluarga*. Universitas Sriwijaya Palembang.
- Arsyad, K.M. dan Soehadi, K. 1982. *Analisis Sperma*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Fransworth, N.R., A.S. Bingel, G.A. Cardell, F.A. Crane dan H.H.S. Fong. 1975. Potensial Value of Plant as Source of New Antifertility Agents. *Journal of Pharmacological Science* (6): 535-598.
- Ganong, W.F. 1993. *Review of Medical Physiology*. 16th ed., New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Guyton, A.C. dan Hall, J. 2000. *Text Book of Medical Physiology*. 10th ed., W.B. Saunders. Philadelphia.
- Gufron, M. dan Soewasono, R. 1989. Gambaran Histologik Spermatogenesis Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Setelah Pemberian Ekstrak Testis Kambing yang Dimurnikan, *BPPS-UGM, Vol. 2 Nomer 3B*.
- Gupta, R.S., Kachhawa, J.B.S. dan Rakhi, S. 2006. *Antispermatozoal effects of Nyctanthes arbortritis in male albino rats*. <http://www.asiaandro.com>.
- Hadley, E.M. 1992. *Endocrinology*. New Delhi: Willey Eastern Private Ltd.
- Hafez, E.S.E. 1987. *Reproduction in Farm Animal*. 5th ed., Bailliere Tindall Ltd.
- Junqueira, L.C. dan J, Carniero. 1980. *Basic Histology (Histologi Dasar)*. Terjemahan

- oleh Adji Dharma. Edisi ke-3. Penerbit EGC. Jakarta, pp.444-456.
- Kemenkes RI. 1993. *Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik*. Kelompok Kerja Phyto Medica.
- Kusumawati, I. 2002, *Uji Aktivitas Anti Inflamasi Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Ekstrak Etanol Daun Graptophyllum Pictum (L) Griff*, Universitas Airlangga. <http://adln.lib.unair.ac.id>.
- Laing, J.A. 1979. *Fertility and Infertility in Domestic Animals*. 3rd. Bailliere Tindall Ltd, 46.
- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi Dasar. Azas Organ sasaran dan Penilaian Resiko*. Edisi 2. UI-Press. Jakarta.
- Mori, H. dan Christensen, A.K., 1980. Morphometric Analysis of Leydig Cells in The Normal Rat Testis, *The Journal of Cell Biology* (84) 340-354 : The Rockefeller University Press.
- Nalbandov, A.V. (1976). *In Reproductive Physiology of mammals and Bird*, W.H. Freeman and Company, San Fransisco.
- Partodiharjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Mutiara Sumber Widya.
- Sabri, E. 2007. Efek Perlakuan Ekstrak Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) pada tahap praimplantasi terhadap Fertilitas dan perkembangan embrio mencit. *Jurnal Biologi* : 2 (2), 28-32.
- Suhargo, L. 2005. Efek Estrogenik Ekstrak Daun Handeuleum (*Graptophyllum pictum (L) Griff*) Pada Histologi Uterus Mencit Betina Ovariectomi, *Berkala Penelitian Hayati*: 10 (107-110).
- Tadjudin, M.K.1984. Tujuan Kontrasepsi Pada Pria, Oligo Zoospermia, Azospermia, Aspermia, *Majalah Kedokteran Indonesia*. Vol. 34. No. 11, . 693-694.
- Thomas, J.A. 1991. *Toxic Responses of Reproductive System*. Dalam : Casarett and Doull's : Toxicology the Basic Science of Poison. 5th edition. Amdur.,M.D., J.Coull, & C.D. Klassen (Ed). Pergamon Press, New York.
- Tolihere, M.R. 1985. *Inseminasi Buatan Pada Ternak Sapi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bandung.
- Zaneveld, L.J.D. dan R.T. Chatterton. 1982. *Biochemistry of Mammalian Reproduction*, Jhon Wiley & Sons.Inc.