

## PERSENTASE SPERMATOZOA HIDUP PADA TIKUS WISTAR DAN SPRAGUE-DAWLEY

### *Percentage of Live Sperm in Wistar and Sprague-Dawley Rats*

Indra Saputra Simbolon<sup>1</sup>, Triva Murtina Lubis<sup>2</sup>, dan Mulyadi Adam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: indrasadindinaf@gmail.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menentukan dan membandingkan persentase spermatozoa hidup dari kauda epididimis pada tikus strain Wistar dan Sprague-Dawley. Dua puluh ekor tikus jantan (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari 10 ekor strain Wistar dan 10 ekor strain Sprague-Dawley berumur 5 bulan digunakan dalam penelitian ini. Pada saat berumur 2,5 bulan seluruh tikus diadaptasikan selama 75 hari di dalam kandang dan diberikan pakan Turbo Feed T.79-4 (PT. Central Protein Prima, Medan) dan minuman secara *ad libitum*. Setelah masa adaptasi selesai, setiap hari diambil masing-masing dua ekor strain Wistar dan Sprague-Dawley untuk dibedah dan diambil kauda epididimisnya. Selanjutnya dibuat preparat hapus semen dengan menggunakan pewarnaan eosin untuk menghitung jumlah spermatozoa hidup. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan 5 lapangan pandang. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji T. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata persentase spermatozoa yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) antara strain tikus Wistar ( $92,00 \pm 2,83\%$ ) dan Sprague-Dawley ( $90,70 \pm 4,37\%$ ). Disimpulkan bahwa persentase spermatozoa hidup pada tikus Wistar lebih tinggi daripada tikus Sprague-Dawley.

Kata kunci: spermatozoa hidup, tikus, Wistar, Sprague-Dawley

#### ABSTRACT

The aims of this study are to determine and compare the percentage of live sperms of cauda epididymis in two different rat strains; Wistar and Sprague-Dawley. This study used 20 male laboratory rats (*Rattus norvegicus*) which are consist of 10 Wistar and 10 Sprague-Dawley rats, aged 5 months. During adaptation, all rats were given commercial feed (Turbo feed, PT. Central Protein Prima, Medan) and drinking *ad libitum*. After adaptation, two rats of each strains were surgieried every day to take their cauda epididymis. Eosin-stained slides were prepared to assess the live and dead sperm cells and observed under a microscope with 5 field of view. The data was analyzed by using T test. The result shows that there is a significant difference ( $P < 0.01$ ) in the average percentage of live sperm between the Wistar ( $92.00 \pm 2.83$ ) and Sprague-Dawley ( $90.70 \pm 4.37$ ) rats. In conclusion, the numbers of live sperm of cauda epididymis in Wistar are higher than those in Sprague-Dawley rats.

Key words: live sperm, rat, Wistar, Sprague-Dawley

#### PENDAHULUAN

Tikus laboratorium (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu hewan yang banyak dimanfaatkan dalam berbagai penelitian ilmiah (Wolfensohn dan Lloyd, 2003). Tikus ini umumnya digunakan sebagai hewan model dalam penelitian-penelitian di bidang psikologi kedokteran, biologi, dan genetika (Harkness dan Wagner, 1989). Para ilmuwan telah memunculkan banyak strain tikus khusus untuk eksperimen. Strain Wistar dan Sprague Dawley merupakan strain yang paling sering digunakan dalam penelitian (Harkness dan Wagner, 1989).

Strain tikus memengaruhi karakteristik biologisnya (Lorentzen dan Klareskong, 1991) dan jenis pakan yang lebih disukai (Laruachagiotis *et al.*, 1994). Pemilihan strain tertentu untuk penelitian tertentu dapat memiliki pengaruh yang signifikan terhadap hasil-hasil penelitian. Sebagai contoh, penggunaan strain tikus yang tepat telah meningkatkan penelitian tentang gen-gen khusus dan fungsi dari produk-produk proteinnya (Wilkinson *et al.*, 2000).

Penelitian tentang reproduksi pada umumnya menggunakan tikus-tikus strain Wistar dan Sprague-Dawley. Kedua strain ini merupakan hasil turunan hubungan jauh (*outbreed*) yang memiliki fertilitasi yang tinggi dan sifat-sifat perkawinan yang konsisten

(Wilkinson *et al.*, 2000). Salah satu faktor yang dijadikan indikator terhadap mutu dan kualitas semen adalah tinggi rendahnya persentase hidup spermatozoa (Bearden dan Fuquay, 1984). Jumlah spermatozoa hidup pada sampel semen dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu umur hewan, jenis pakan yang dikonsumsi, radikal bebas, suhu, pH, dan viskositas pengencer serta variasi individu (Garner dan Hafez, 2000). Menurut Hartini (2011) jumlah spermatozoa yang diproduksi tergantung pada proses yang terjadi selama spermatogenesis. Spermatozoa dapat hidup karena sanggup mencerna beberapa zat yang terdapat di dalam cairan asesoris, cairan di dalam saluran kelamin betina dan di dalam media pengencer (Hardjopranjoto, 1994).

Permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein (Garner dan Hafez, 2000). Apabila sel spermatozoa tersebut mati, permeabilitas membrannya meningkat terutama di daerah kepala (*post nuclear caps*) dan hal ini merupakan dasar pewarnaan spermatozoa yang membedakan spermatozoa hidup dari yang mati (Salisbury dan VanDemark, 1985). Informasi tentang karakteristik semen terutama spermatozoa hidup dari kauda epididimis pada tikus strain Sprague-Dawley dan Wistar di Indonesia masih terbatas. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian terhadap persentase spermatozoa hidup epididimis pada

kedua strain ini yang dapat digunakan sebagai informasi tambahan mengenai strain tikus yang tepat untuk penelitian mengenai kualitas spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan mengetahui dan membandingkan persentase spermatozoa hidup dari kauda epididimis pada masing-masing strain tikus. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai jumlah spermatozoa hidup dari kauda epididimis tikus strain Wistar dan Sprague-Dawley sehingga diperoleh strain tikus yang tepat untuk dijadikan hewan model pada penelitian mengenai kualitas spermatozoa.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan tikus strain Wistar dan Sprague-Dawley masing-masing 10 ekor, berumur 5 bulan, dan dalam keadaan sehat. Penelitian berlangsung dari bulan Februari sampai April 2012 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.

### Pemeliharaan dan Adaptasi Tikus

Seluruh tikus yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Balai Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan (P2PL) Jakarta. Tikus memiliki sertifikat sehat dan berumur 2,5 bulan. Seluruh tikus diadaptasikan selama 75 hari di dalam Unit Pelaksana Teknis (UPT). Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. Selama masa adaptasi seluruh tikus diberikan pakan komersial standar yaitu pelet (*Turbo Feed T.79-4* atau pakan ikan terapung masa pertumbuhan akhir, PT. Central Protein Prima, Medan) dan minuman secara *ad libitum*. Komposisi *Turbo Feed* terdiri atas protein 16-18%, lemak 4%, kadar abu 12%, serat 8%, dan kadar air 12%.

### Koleksi Sperma Epididimis Tikus

Setelah masa adaptasi, setiap hari 4 ekor tikus (2 ekor tikus dari masing-masing strain) dietanasi dengan kloroform secara inhalasi, kemudian tikus dibedah untuk pengambilan epididimis. Kauda epididimis kiri dan kanan disayat untuk mengeluarkan spermatozoa. Kemudian kauda epididimis diletakkan di dalam cawan petri yang telah berisi NaCl fisiologis 1 ml dan dipotong kecil-kecil dan dibiarkan 1-2 menit untuk memberikan kesempatan bagi spermatozoa keluar dari epididimis dan menyebar.

### Evaluasi Spermatozoa Hidup

Evaluasi spermatozoa yang hidup dilakukan berdasarkan Manual Laboratorium WHO (1999). Satu tetes eosin 2% diteteskan pada ujung gelas obyek kemudian ditambahkan 1 tetes semen tikus (10  $\mu$ l), dihomogenkan dan selanjutnya dibuat preparat ulas. Preparat ulas lalu difiksasi di atas nyala api. Spermatozoa yang hidup dievaluasi di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x dalam 5 lapangan pandang untuk memperoleh 200 spermatozoa. Jumlah spermatozoa yang hidup dinyatakan dalam persen.

Untuk penentuan persentase spermatozoa yang hidup digunakan rumus:

Persentase spermatozoa (%)

$$= \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Hidup}}{\text{Jumlah Spermatozoa Hidup dan Mati (200)}} \times 100 \%$$

Spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna eosin. Spermatozoa yang telah mati akan berwarna merah-keunguan karena rusaknya membran plasma sel spermatozoa (Ax *et al.*, 2000). Setelah penghitungan selesai, dilakukan pengambilan gambar dari mikroskop dengan menggunakan kamera Canon (PowerShot A3400 IS, Japan).

### Analisis Data

Data persentase spermatozoa yang hidup dan mati yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan uji T (Steel dan Torrie, 1990).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kehidupan spermatozoa sangat tergantung kepada persediaan energi yang terkandung di dalam tubuhnya. Di luar alat kelamin jantan, spermatozoa mampu memakai sumber energi dari luar untuk kelanjutan hidupnya (Hardjopranjoto, 1995) misalnya fruktosa yang akan diubah menjadi asam laktat dan energi dengan bantuan enzim fruktolisin (Partodihardjo, 1980). Dalam penelitian ini digunakan larutan NaCl fisiologis yang berfungsi untuk mempertahankan daya hidup (viabilitas) spermatozoa di luar tubuh tikus. Larutan NaCl fisiologis digolongkan sebagai bahan pengencer (*extender*) yang sering digunakan karena larutan ini dapat memberikan sifat bufer, mempertahankan pH semen dalam suhu kamar, bersifat isotonis dengan cairan sel, melindungi spermatozoa terhadap *cold shock*, dan menyeimbangkan elektron yang sesuai (Nilna, 2010).

Kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis umumnya hanya berkisar antara 1-2 menit (Effendy, 1997). Penggunaan larutan NaCl fisiologis mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit (Rustidja, 2000). Menurut Isnaini dan Suyadi (2000), jika dilakukan penyimpanan semen dengan penggunaan larutan NaCl fisiologis, spermatozoa hanya bisa bertahan dan dapat digunakan hingga 60 menit karena meskipun NaCl mengandung elektrolit yang isotonis dengan cairan sel namun kurang mengandung sumber energi atau nutrisi untuk mempertahankan spermatozoa agar bisa tetap hidup. Oleh karena itu, pada penelitian ini penting diperhatikan lama pembuatan preparat semen untuk menjaga agar kualitas spermatozoa tetap bisa hidup. Waktu yang dibutuhkan mulai dari koleksi spermatozoa epididimis tikus, pembuatan preparat apus hingga evaluasi spermatozoa hidup lebih kurang 5 menit per sampel. Dengan kisaran waktu tersebut diperkirakan tidak memengaruhi jumlah spermatozoa hidup tikus yang diteliti.

### Persentase Spermatozoa Hidup pada Tikus Wistar

Menurut Oyeyemi *et al.* (2008) jumlah spermatozoa yang hidup dan konsentrasi sel-sel spermatozoa yang dihasilkan oleh testes menentukan fertilitas hewan jantan. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa rata-rata persentase spermatozoa hidup pada kauda epididimis tikus albino strain Wistar adalah 92% seperti yang disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Nilai rata-rata ( $\pm$ SD) persentase spermatozoa tikus strain Wistar dan Sprague-Dawley

| Parameter             | Wistar                        | Sprague-Dawley                |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Spermatozoa hidup (%) | 92,00 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup> | 90,70 $\pm$ 4,37 <sup>b</sup> |

<sup>a, b</sup>Superskrip yang berbeda pada baris yang sama memperlihatkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ )

Rata-rata persentase spermatozoa hidup yang diperoleh dalam penelitian ini lebih besar bila dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan oleh Oyeyemi *et al.* (2006) yaitu 88,00 $\pm$ 3,39% dan Saba *et al.* (2009) sebesar 88,75 $\pm$ 2,39 % untuk tikus jantan Wistar tanpa perlakuan. Namun demikian, persentase yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah dari hasil yang diperoleh Raji *et al.* (2005) yang memperoleh rata-rata persentase spermatozoa hidup pada tikus Wistar dewasa nonperlakuan adalah 98%. Menurut Stephen dan Yinusa (2011) spermatozoa hidup pada Wistar usia 10-12 minggu bervariasi 73,60 $\pm$ 1,40 dan 85,80 $\pm$ 1,80%.

Beberapa faktor yang memengaruhi perbedaan hasil penelitian ini dibandingkan hasil penelitian lainnya. Perbedaan jenis dan komposisi pakan yang diberikan serta adanya variasi-variasi individu di antara strain Wistar diduga kuat sebagai faktor yang menyebabkan hasil penelitian ini berbeda dengan hasil yang telah dilaporkan oleh peneliti lain. Protein memiliki peranan penting di dalam pertumbuhan dan pemeliharaan jaringan tubuh termasuk jaringan testes, sintesis hormon, dan sebagai sumber energi sehingga defisiensi protein dapat menurunkan fungsi reproduksi (Hardjoprano, 1995).

### Persentase Spermatozoa Hidup Tikus pada Sprague-Dawley

Dari hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa tikus strain Sprague-Dawley memiliki persentase spermatozoa hidup sebesar 90%. Persentase ini termasuk bagus dan lebih tinggi bila dibandingkan dengan persentase spermatozoa hidup pada tikus Sprague-Dawley yang diperoleh oleh Hala (2011) yaitu 88%. Perbedaan ini diduga karena pengaruh umur, variasi individu, dan jenis pakan yang diberikan. Menurut Garner dan Hafez (2000) jumlah spermatozoa hidup pada sampel semen dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu umur hewan, jenis pakan yang dikonsumsi, radikal bebas, suhu, pH, dan viskositas pengencer serta variasi individu (Garner dan Hafez, 2000). Pada penelitian ini digunakan tikus Sprague-Dawley yang berumur 5 bulan sedangkan

tikus yang digunakan oleh Hala (2011) berumur 3-4 bulan.

### Perbandingan Persentase Spermatozoa Hidup antara Tikus Wistar dan Sprague-Dawley

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase spermatozoa tikus Wistar berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) dengan tikus Sprague-Dawley. Lorentzen dan Klareskong (1991) menyatakan bahwa strain tikus turut memengaruhi karakteristik biologisnya. Tikus strain Wistar memiliki rata-rata spermatozoa hidup (92%) yang lebih tinggi dibandingkan dengan persentase spermatozoa hidup pada Sprague-Dawley (90,7%). Perbedaan jumlah spermatozoa hidup antar kedua strain tikus ini kemungkinan disebabkan karena perbedaan jumlah asupan pakan pelet yang dikonsumsi oleh setiap individu. Meskipun seluruh hewan coba diberikan jenis pakan yang sama, yaitu *Turbo Feed* yang mengandung 16-18% protein namun tidak diketahui jumlah pakan yang dikonsumsi per hari oleh setiap individu tikus sehingga jumlah nutrisi yang digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan spermatozoa antar individu ikut bervariasi.

Di dalam penelitian ini diduga tikus-tikus Wistar mengonsumsi lebih banyak pakan dibandingkan Sprague-Dawley sehingga pada umur yang sama (5 bulan) tikus Wistar memiliki berat testes dan epididimis serta jumlah spermatozoa hidup yang lebih tinggi daripada Sprague-Dawley. Menurut Dethan *et al.* (2010) pakan adalah salah satu faktor penting untuk mendapatkan produksi spermatozoa yang berkualitas. Pakan yang mengandung cukup keseimbangan nutrisi akan sangat membantu pertumbuhan dan reproduksi secara normal. Selanjutnya Cheah dan Yang (2011) menyatakan bahwa apabila tubuh kekurangan asupan gizi maka dapat mengurangi berat badan serta kualitas spermatozoa, salah satunya viabilitas spermatozoa.

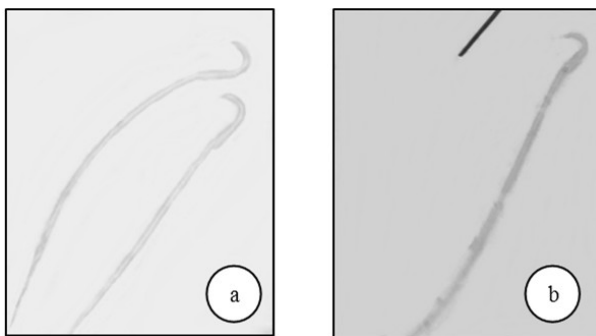
Selain faktor yang telah disebutkan di atas, faktor eksternal seperti metode penanganan semen dan ketelitian penghitungan juga berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa hidup di dalam sampel semen. Varisli *et al.* (2009) menyatakan bahwa faktor lain yang memengaruhi hasil penelitian adalah keterampilan dan ketelitian peneliti pada saat menghitung jumlah spermatozoa hidup. Oleh karena itu, untuk menghindari tingkat kesalahan penghitungan yang tinggi sehingga mendapatkan hasil yang lebih akurat maka mulai dari proses koleksi semen hingga penghitungan persentase spermatozoa hidup dari kauda epididimis pada seluruh tikus dalam penelitian ini hanya dilakukan oleh satu orang peneliti.

Jumlah spermatozoa hidup di dalam sampel semen juga kemungkinan ditentukan oleh banyak atau sedikitnya radikal bebas yang terbentuk. Radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*) adalah atom atau gugus yang orbital luarnya memiliki elektron yang tidak berpasangan, bersifat magnetik, reaktif dan oksidan yang dapat menimbulkan kerusakan atau kematian sel (Wijaya, 1996). Radikal bebas secara berkesinambungan dapat

terbentuk dalam tubuh sebagai bagian dari metabolisme sel normal. Sumber ROS pada semen adalah komponen seluler semen, yaitu spermatozoa, leukosit, dan sel-sel muda (Iwasaki dan Gagnon, 1992). Spermatozoa abnormal menjadi sumber ROS terutama yang mengandung sisa-sisa sitoplasma karena kegagalan proses spermatogenesis (Gavella *et al.*, 1996). Senyawa ROS berpotensi toksik terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa (Soehadi, 1996). Pembentukan ROS yang berlebihan dihubungkan dengan penurunan fertilisasi (kecepatan, morfologi, motilitas dan daya hidup atau viabilitas spermatozoa). Radikal bebas juga dapat menimbulkan gangguan hormonal dan spermatogenesis (Diska *et al.*, 2011).

Spermatozoa mudah terserang oleh induksi stres oksidatif karena dalam membran plasmanya banyak terkandung fosfolipid dan asam lemak tidak jenuh. Stres oksidatif berperan sebagai mediator kerusakan pada membran plasma, sehingga mengurangi kualitas spermatozoa. Senyawa ROS menginduksi lipid peroksidasi yang merupakan agen penyebab perubahan morfologi spermatozoa. Stres oksidatif menginduksi kerusakan DNA yang mempercepat apoptosis/kematian sel epitel germinal, sehingga menurunkan hitung jumlah spermatozoa (Soehadi, 1996).

Aktivitas metabolisme sel spermatozoa juga dapat menyebabkan kematian pada sel spermatozoa itu sendiri karena metabolisme sel akan menghasilkan asam laktat dan apabila tidak tersedia energi untuk merombak kembali asam laktat menjadi energi yang dibutuhkan untuk aktivitas gerak spermatozoa maka akan menyebabkan penumpukan asam laktat yang dapat menurunkan pH semen atau pengencer. Menurut Toelihere (1993), kadar asam laktat yang cukup tinggi akan menghambat aktivitas metabolisme sel dan juga merupakan racun bagi spermatozoa yang dapat menyebabkan kematian sel spermatozoa.



**Gambar 1.** Spermatozoa tikus a). Spermatozoa hidup b). Spermatozoa mati

Morfologi spermatozoa hidup dari tikus disajikan pada Gambar 1. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna eosin sehingga pada bagian kepala spermatozoa tidak terwarnai sedangkan spermatozoa yang mati ditandai dengan bagian kepala yang terwarnai lebih pekat. Sali *et al.* (2006) menyatakan bahwa untuk membedakan spermatozoa hidup dan mati, dapat dilihat pada bagian kepala spermatozoa. Spermatozoa yang hidup tidak terwarnai, sedangkan

spermatozoa yang mati pada bagian kepalanya akan berwarna merah keunguan dengan pewarnaan eosin negrosin 0,2%. Selanjutnya Salisbury dan VanDemark (1985) menyatakan bahwa pada sel spermatozoa yang telah mati, permeabilitas membran selnya meningkat terutama di daerah kepala (*post nuclear caps*) dan hal ini merupakan dasar pewarnaan spermatozoa untuk membedakan spermatozoa yang hidup dan mati.

Spermatozoa mati akan menyerap zat warna disebabkan karena rusaknya membran plasma pada spermatozoa sehingga pompa sodium tidak lagi berfungsi dengan baik untuk mengatur sirkulasi zat-zat dari dan ke luar sel sehingga pewarna eosin dapat masuk ke dalam sel dan tetap tinggal di dalam dan mewarnai spermatozoa menjadi merah keunguan terutama pada bagian kepala. Spermatozoa yang hidup memiliki membran plasma yang masih utuh sehingga pompa natrium dapat berfungsi dengan baik. Enzim  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPase yang terdapat pada membran plasma akan memompa kembali ion Na yang berikatan dengan pewarna eosin ke luar dari sel (Fitriani *et al.*, 2010).

## KESIMPULAN

Tikus strain Wistar memiliki jumlah spermatozoa yang hidup lebih tinggi dibandingkan strain Sprague-Dawley

## DAFTAR PUSTAKA

- Ax, R.L., M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, and M.E. Bellin. 2000. Semen Evaluation. In **Reproduction in Farm Animals**. 7th ed. B. Hafez and E.S.E. Hafez (Eds). Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1984. **Applied Animal Reproduction**. 2nd ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Cheah, Y and W. Yang. 2011. Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. **J. Biosci. Biotechnol.** 2:182-197.
- Dethan, A.A., Kustono dan H. Hari. 2010. Kualitas dan kuantitas sperma kambing Bligon jantan yang diberi pakan rumput gajah dengan suplementasi tepung darah. **Buletin Peternakan.** 34(3):145-153.
- Diska, P., Yanwirasti, dan E. Anas. 2011. Pengaruh diet tinggi lemak hewani dan nabati terhadap kualitas spermatozoa pada tikus jantan strain Wistar. **Tesis**. Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.
- Effendy, M.I. 1997. **Metode Biologi Perikanan**. Yayasan Pustaka Dwi Sri, Bogor.
- Fitriani, K., Eriani, and W. Sari. 2010. The effect of cigarettes smoke exposed causes fertility of male mice (*Mus musculus*). **Jurnal Natural.** 10(2):12-17.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In **Reproduction in Farm Animals**. 7th ed. B. Hafez and E.S.E. Hafez (Eds). Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Gavella M., V. Lipovac, M. Vucic, and B. Rocic. 1996. Superoxide anion scavenging capacity of human plasma sperm. **Int. J. Androl.** 19:62-90.
- Hala, M.A.W. 2011. Protective effect of *Nigella sativa linseed* and celerg oils against testicular toxicity induced by sodium valproate in male rats. **J.America Sci.** 7(5):687-693.
- Hardjanto dan S. Hardjopranjoto. 1994. **Ilmu Inseminasi Buatan**. Airlangga University Press, Surabaya.
- Hardjopranjoto, S. 1995. **Ilmu Kemajiran pada Ternak**. University Airlangga Press, Surabaya.
- Harkness, J.E. and J.E. Wagner. 1989. **The Biology and Medicine of Rabbit and Rodent**. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Hartini. 2011. Pengaruh Dekok Daun Jambu Biji Merah (*Psidium Guajava L*) terhadap Jumlah Kecepatan dan Morfologi

- Spermatozoa Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*). **Tesis**. Program Studi Ilmu Biomedik. Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.
- Isnaini, N. dan Suyadi. 2000. Kualitas semen ayam Kedu pada suhu kamar dalam pengencer larutan NaCl fisiologis dan Ringer's. **Jurnal Ternak Tropika** 1(2):55-56.
- Iwasaki, A. and C. Gagnon. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertil. Steril.** 57:409-416.
- Laruachagiotis, C., M. Gubern, M.C. Laury, and J. Louissylvestre. 1994. Energy-balance in an inbred strain of rats-comparison with the Wistar strain. **Physiology and Behavior** 55:483-487.
- Lorentzen, J.C. and L. Kloreskog. 1996. Susceptibility of DA rats to arthritis induced with adjuvant oil or rat collagen is determined by genes both within and outside the major histocompatibility complex. **Scandinavian J. Immunol.** 44:592-598.
- Nilna. 2010. **Standar Operasional Pekerjaan Prosesing Semen**. Dinas Peternakan Provinsi Sumatera Barat, Padang.
- Oyeyemi, M.O., A.T. Bisoye, and E.O.D. Olufunke. 2006. The reproductive implications of clomiphene citrate on sperm cells during the epididymal transit of spermatozoa in male Wistar rats. **Folia Veterinaria** 50:131-133.
- Oyeyemi, M.O., O. Oluwatoyin, O.O.A. Leigh, T. Adesiji, and E. Fisayo. 2008. The spermogram of male wistar rats treated with aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina*. **Folia Veterinaria** 52(2):98-101.
- Partodihardjo, S. 1980. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Press, Jakarta.
- Raji, Y., S.O. Ifabunmi, O.S. Akinsomisoye and A.K. Oloyo. 2005. Gonadal responses to antipsychotic drugs: chlorpromazine and thioridazine reversibly suppress testicular function in albino rats. **International J. Pharmacol.** 1(3):287-292.
- Rustidja. 2000. **Prospek Pembekuan Sperma**. Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Saba, A.B., O.A. Oridupa, M.O. Oyeyemi, and O.D. Osanyigbe. 2009. Spermatozoa morphology and characteristics of male Wistar rats administered with ethanolic extract of *Lagenaria Breviflora* Roberts. **African J. Biotechnol.** 8(7):1170-1175.
- Saili, T., M.A. Setiadi, S. Agungpriyono, M.R. Toelihere, dan A. Budiono. 2006. Pengaruh pengering beku terhadap perubahan morfologi spermatozoa domba. **Agriplus.** 16(2):107-117.
- Salisbury, G.W. and N.L. Van Demark. 1985. **Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi**. (Diterjemahkan oleh R. Djanuar) Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Soehadi, K. 1996. **Diabetes Mellitus Pria: Profil Spermogram, Hormon Reproduksi dan Potensi Seks**. Airlangga University Press, Surabaya.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1990. **Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometri**. Diterjemahkan oleh Bambang Sumantri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Stephen, A.O. and R. Yinusa. 2011. Prolonged administration of proguanil induces reproductive toxicity in male rats. **The J. Toxicol. Sci.** 36(5):587-599.
- Varisli, O., C. Uguz, C. Agca, and Y. Agca. 2009. Various physical stress factors on rats sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane. **J. Androl.** 30(1):75-86.
- WHO. 1999. **Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction**. 4th ed. Cambridge University Press, England.
- Wijaya, A. 1996. **Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan**. Forum Diagnosticum.
- Wilkinson, J.M., S. Halley, and P.A. Tower. 2000. Comparison of male reproductive parameter in three rat strains: Dark Agouti, Sprague-Dawley, and Wistar. **Laboratory Animal.** 34:70-75.
- Wolfensohn, S and M. Lloyd. 2003. **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. 3rd ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.