

Konsentrasi Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus*) Swiss Webster L. setelah

Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica*) dengan Dosis

Kronik

Muhammad Anwar Djaelani*

*Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi F. MIPA UNDIP

Abstract

The aim of this research was to prove the side effect of *C.domestica* rhizomes on *M. musculus* spermatogenesis. The effect was determined by sperm concentration differences between control and treatment group. Male *M. musculus* were divided into three groups, there are control group, positive control group and treatment group. Treatment were given orally with chronic exposure during 60 days. The samples were isolated from pars caudalis epididymis at 13th, 61st and 73rd day of treatment. The result showed that there was a significantly difference between control group and treatment, but there were no differences between control group and positive control group. It could be concluded that the *C.domestica* rhizomes potentially influence *M.musculus* spermatogenesis.

Key words : *C.domestica*, spermatogenesis, *M.musculus*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek samping pemberian serbuk rimpang kunyit terhadap proses spermatogenesis *Mus musculus* jantan. Efek paparan serbuk kunyit ditunjukkan dengan perbedaan konsentrasi spermatozoa antara kelompok kontrol dan perlakuan. Hewan uji *M.musculus* jantan dikelompokkan menjadi tiga yaitu kelompok kontrol, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Pemberian bahan uji dilakukan per oral, dengan dosis kronik yang diberikan tiap hari berturut-turut berlangsung selama 60 hari. Pengambilan sampel spermatozoa dilakukan dengan mengambil semen pada *pars caudalis epididymis* pada ke 13, 61 dan 73 setelah perlakuan. Data menunjukkan konsentrasi spermatozoa hewan uji kelompok kontrol berbeda tidak bermakna dengan hewan uji kelompok kontrol positif, tetapi konsentrasi spermatozoa hewan uji kelompok kontrol dan kelompok kontrol positif berbeda bermakna dengan hewan uji kelompok perlakuan. Dapat disimpulkan bahwa pemberian serbuk rimpang kunyit berpotensi menghambat spermatogenesis *Mus musculus*.

Kata kunci: *C. domestica*, spermatogenesis, *M.musculus*

PENDAHULUAN

Penggunaan obat tradisional dewasa ini kembali berkembang dan banyak diminati masyarakat. Hal tersebut disebabkan obat tradisional bagi sebagian masyarakat dianggap lebih murah, mudah didapat tanpa resep dokter. Penggunaan obat tradisional juga

diyakini tidak mempunyai efek samping, sehingga dianggap aman jika terus dikonsumsi berkelanjutan.

Sebagian besar obat tradisional mempunyai komponen utama tanaman golongan empon-empon (familia Zingiberaceae), terutama genus *Curcuma*.

Tanaman kunyit (*Curcuma domestica*), temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) merupakan bahan yang mendominasi komposisi hampir sebagian besar obat tradisional. Bahan-bahan tersebut digunakan tidak hanya sebagai campuran pewarna agar produk lebih menarik tetapi juga sebagai bahan pemberi aroma. Di Indonesia, kunyit dipakai sebagai zat aditif makanan, pewarna dan penambah aroma makanan, disamping hal tersebut kunyit juga dipakai sebagai bahan dasar kosmetika.

Berbagai manfaat kunyit sebagai obat tradisional sudah banyak diteliti dan tidak diragukan lagi. Hal ini terbukti bahwa jamu tradisional dengan bahan baku kunyit telah terdaftar di Balai Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan R.I. dan telah diproduksi oleh beberapa perusahaan jamu terkenal. Namun, penelitian mengenai efek samping yang ditimbulkan oleh penggunaan kunyit sebagai obat tradisional terhadap proses fisiologi dalam tubuh hewan dan manusia belum banyak dikaji.

Spermatogenesis merupakan salah satu proses pembentukan spermatozoa melalui serangkaian pembelahan sel pembentuknya (spermatogonia) yang terjadi pada tubulus seminiferus testis hewan jantan. Proses ini sangat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan, baik internal maupun eksternal, yang pada akhirnya akan mempengaruhi jumlah dan vitalitas spermatozoa yang terbentuk.

Berdasarkan uraian tersebut di atas perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan

pengaruh efek samping yang ditimbulkan oleh penggunaan kunyit sebagai obat tradisional terhadap jumlah spermatozoa mencit (*Mus musculus*)

Kunyit merupakan tanaman semak, berbatang semu, tegak, tinggi dapat mencapai 70 cm. Pangkal batang merupakan rimpang yang berwarna hijau, putih, kekuningan. Daun tunggal bentuk lanset memanjang, helai daun tipis, tepi rata dan berwarna hijau pucat. Rimpang terdapat di bagian pangkal batang, berkulit coklat, bersisik, dan jika diiris bagian dalamnya berwarna kuning. Kunyit merupakan jenis empon-empon yang sangat dikenal masyarakat di seluruh Indonesia. Rimpang kunyit mengandung curcumin yang berwarna kuning, saponin, flavonoid, minyak atsiri, polifenol (Gunawan, 2002). Kandungan curcumin pada kunyit berkisar 4 – 8% dalam simplisia rimpang, yang merupakan agensia farmakologis paling aktif (Ruby, 1995). Kandungan curcumin dalam kunyit adalah 80 mg/g serbuk rimpang. Penggunaan kunyit umumnya dalam bentuk serbuk rimpang atau ekstrak cair dengan perbandingan 1:1 dengan pelarut etanol 45%. Pada orang dewasa dosis serbuk rimpang kunyit berkisar 1,5 – 3 gram/hari (Mills & Bone, 2000).

Curcumin merupakan pigmen berwarna kuning yang diisolasi dari rimpang beberapa spesies curcuma. Salah satu species curcuma adalah kunyit (*Curcuma domestica*). Pigmen ini umumnya digunakan sebagai rempah – rempah dan pewarna makanan, juga sebagai campuran kosmetik dan obat (Lin dan

Shiau, 2001; Kuo *et al.*, 1996 ; Gunawan, 2002). Curcumin alami memiliki aktivitas yang sama dengan curcumin sintetis (Anonim, 1995).

Penelitian dengan menggunakan curcumin menunjukkan bahwa curcumin memiliki manfaat sebagai antioksidan (Lin dan Shiau, 2001; Kuo *et al.*, 1996), anti inflamasi (Kuo *et al.*, 1996 ; Sreejayan, 1997; Lin dan Shiau, 2001). Namun efek curcumin sangat tergantung pada waktu dan dosis pemaparan (Lin dan Shiau, 2001).

Konsumsi atau intake curcumin umumnya per oral, namun efek curcumin secara *in vitro* akan sama dengan pengujian secara *in vivo*. Curcumin di dalam tubuh akan mengalami biotransformasi menjadi dihidrocurcumin dan tetrahydrocurcumin. Selanjutnya dihidrocurcumin dan tetrahydrocurcumin akan mengalami konversi menjadi konjugat monoglukoronida. (Pan *et al.*, 1999).

Dalam menekan perkembangan sel-sel kanker, curcumin akan menghambat pengikatan faktor tumbuh ekstraselular yaitu TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) pada membran reseptor. TPA merupakan agensia yang diperlukan untuk memacu proliferasi sel dengan mengaktifasi induksi ornitin karboksilase, peningkatan protein kinase C, induksi siklooksigenase dan lipooksidase serta peningkatan onkogen c-jun, c-fos dan c-myc. (Lin *et al.*, 1994). Menurut Awasithi (1996), penghambatan perkembangan sel kanker juga disebabkan

karena curcumin dapat menekan fungsi sitokrom p 450 reduktase yang berperan dalam siklus asam trikarboksilat.

Proliferasi atau memperbanyak sel dan apoptosis atau kematian sel yang terprogram, merupakan proses yang terjadi selama perkembangan dan pertumbuhan individu. Proliferasi sel baik secara mitosis maupun meiosis, menyebabkan penambahan massa sel dengan laju tertentu. Sebaliknya apoptosis akan menyebabkan kematian sel sehingga populasi sel selalu terjaga stabil (Carlson, 1988).

Spermatogenesis merupakan proses pembentukan sperma yang berlangsung dalam testis. Pada Rodentia proses ini memerlukan waktu 48 hari atau akan selesai setelah menempuh empat kali daur epitel seminiferus. Lama satu daur epitel seminiferus adalah 12 hari sehingga setiap selang waktu 12 hari spermatogonia A akan memasuki spermatogenesis dan pada saat bersamaan spermatozoa yang telah terbentuk dilepaskan ke dalam lumen tubulus seminiferus (Johnson & Everitt, 1988).

Proses pembentukan spermatozoa merupakan proses yang kompleks, yang meliputi tiga fase, yaitu multiplikasi secara mitosis, meiosis dan transformasi. Pembelahan mitosis menyebabkan terjadinya memperbanyak sel. Sedangkan pembelahan meiosis terutama menyebabkan terjadinya reduksi jumlah kromosom. Rangkaian pembelahan selama spermatogenesis menyebabkan tahapan perkembangan spermatogonia menjadi

spermatisit primer, spermatisit sekunder, spermatid dan berakhir dengan spermatozoa dengan bentuk khas yaitu mempunyai kepala, leher dan ekor. Spermatozoa yang sudah terbentuk akan menempati lumen tubulus seminiferus. Selanjutnya spermatozoa secara berurutan akan menempati *tubulus rete testis*, *vasa eferensia*, *vasa deferensia* dan *epididymis*. Spermatozoa dalam *pars caudalis epididymis* telah mengalami maturasi dan siap diejakulasikan (Johnson and Everitt, 1988).

Spermatozoa hasil ejakulasi harus memiliki kualitas yang baik agar dapat digunakan untuk melanjutkan proses reproduksi hewan tersebut. Untuk mengetahui kualitas spermatozoa dapat ditentukan diantaranya dengan melihat jumlah spermatozoa yang dihasilkan. Jumlah spermatozoa dinyatakan dalam satuan juta tiap ml (WHO, 1999).

METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Struktur Hewan Jurusan Biologi FMIPA UNDIP. Rancangan dasar yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Munawar, 1995)

Hewan uji penelitian ini adalah *Mus musculus* jantan berumur 30 hari, dengan berat badan berkisar 25 – 30 gram. Untuk mendapatkan data yang terdistribusi normal diperlukan minimal 30 hewan uji (Usman & Akbar, 1995). Hewan uji dikelompokkan menjadi : kelompok kontrol I (tanpa

perlakuan), kelompok kontrol II (diperlakukan dengan pemberian kemasan kapsul beserta bahan tambahannya), kelompok perlakuan (diperlakukan dengan pemberian serbuk rimpang kunyit 1800 mg / Kg berat badan perhari). Pada masing–masing kelompok ditentukan 3 titik pengamatan masing–masing dengan 8 ulangan. Dengan demikian jumlah hewan keseluruhan 72 ekor.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis serbuk rimpang kunyit. Variabel tergantung yang diamati pada penelitian adalah konsentrasi spermatozoa, yang diamati sebelum dan sesudah perlakuan

Bahan uji berupa serbuk rimpang kunyit ditimbang sesuai dengan dosis berdasarkan penelitian Mills & Bone (2000). Sesuai angka konversi untuk mencit menurut Laurence dan Bacharach (1964), maka dosis untuk mencit dengan berat berkisar 30 gram adalah 1800 mg/ Kg berat badan. Selanjutnya serbuk rimpang kunyit dicampur dengan fruktosa dalam jumlah tertentu sampai homogen. Campuran bahan dinyatakan homogen bila warna kuning dari curcumin telah tersebar merata. Setelah homogen, campuran bahan ditimbang kembali dan ditambahkan fruktosa sampai campuran dapat dikemas dalam kemasan kapsul.

Semua hewan uji dipelihara dalam kandang khusus untuk memelihara *Mus musculus*. Pemeliharaan dilakukan dengan pencahayaan alami dengan kepadatan satu ekor tiap kandang. Alas kandang diberi sekam yang diganti tiap tiga hari sekali. Selama

pemeliharaan semua hewan uji diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Air minum diberikan melalui botol khusus untuk pemberian minum mencit (*Mus musculus*) sedangkan pakan diberikan dalam bentuk pellet.

Aklimasi dilakukan dengan menempatkan hewan uji dalam kandang selama satu minggu. Selama penelitian kandang ditempatkan pada tempat tertentu sehingga semua hewan uji mendapatkan faktor lingkungan (antara lain cahaya, temperatur dan kelembaban) yang homogen dan konstan.

Dosis perlakuan serbuk rimpang kunyit sebesar 1800 mg/ berat badan. Kelompok perlakuan terdiri dari : Kelompok K I adalah kelompok kontrol, tanpa pemberian bahan uji. Kelompok K II adalah kelompok kontrol positif dengan pemberian kemasan kapsul beserta bahan tambahannya. Kelompok P adalah kelompok perlakuan dengan pemberian bahan uji dengan dosis. 1800 mg/ berat badan

Pemberian bahan uji dilakukan per oral, dengan dosis kronik yang diberikan tiap hari berturut-turut berlangsung selama 60 hari, sesuai pendapat Whitten *et al.*(1995) yang menyatakan bahwa dosis kronik pada mencit (*Mus musculus*) minimal diberikan selama 22 hari berturut-turut.

Pengambilan sampel spermatozoa dilakukan dengan mengambil semen pada *pars caudalis epididymis* dengan menggunakan microsyringe 10 μ l, yang telah diisi dengan

campuran minyak paraffin dengan zat warna Sudan Black, selanjutnya dilakukan pengenceran. Konsentrasi spermatozoa ditentukan dengan metode Anonim (1999) dan Bryan (1970).

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-13, 61 dan ke-73 perlakuan. Semua data dikumpulkan dan ditabulasikan untuk selanjutnya dianalisis. Semua analisis dilakukan secara komputersasi menggunakan program SPSS Versi 10.01 (Santosa, 1999).

Data hasil penelitian diuji pola distribusinya dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dan dilanjutkan dengan uji homogenitas variansi. Hasil uji pola distribusi menunjukkan semua data mengikuti pola distribusi normal dan variansinya homogen maka untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji statistik dengan menggunakan analisis parametrik dengan menggunakan uji t (Munawar, 1995). Analisis statistik menggunakan program komputer SPSS (Santosa, 1999).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penghitungan konsentrasi spermatozoa *Mus musculus* setelah perlakuan serbuk kunyit dengan dosis kronis disajikan pada Tabel 01.

Tabel 01. Rerata Jumlah Spermatozoa per mm³ semen Mencit (*Mus musculus*)

Hari Pengamatan	Hari 13	Hari 61	Hari 73
Kelompok			
K I	29745 ^a ± 313,08	29184 ^a ± 285,38	29517 ^a ± 243,47
KII	29225 ^a ± 299,23	28932 ^a ± 279,46	29074 ^a ± 263,07
P	25252 ^b ± 319,24	23528 ^c ± 354,47	28957 ^a ± 324,14

Keterangan : Angka dengan superskrip yang sama menunjukkan perbedaan tidak bermakna, sedangkan angka dengan superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan bermakna pada taraf kepercayaan 95%.

Hasil analisa statistik dengan Anova dan dilanjutkan dengan uji t (pada taraf kepercayaan 95%) menunjukkan bahwa kelompok kontrol (KI, tanpa perlakuan) menunjukkan berbeda tidak bermakna dengan kelompok kontrol positif (KII, perlakuan dengan kapsul dan bahan tambahan). Jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan curcumin (P), kelompok kontrol maupun kelompok kontrol positif menunjukkan perbedaan bermakna.

Perbedaan tidak bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok kontrol positif menunjukkan bahwa bahan pengemas sediaan perlakuan, yaitu kapsul dan fruktosa, dapat ditolerir dalam sistem digesti hewan uji. Kapsul serta fruktosa juga tidak mempengaruhi proses spermatogenesis hewan uji.

Penelitian ini dilakukan dengan dosis kronis pada 3 (tiga) titik pengamatan, yaitu hari ke-13, 61 dan 73. Penentuan titik pengamatan didasarkan bahwa siklus epitel epidimis yang berlangsung 48 hari, sedangkan spermatogonia akan memasuki spermatogenesis setiap selang 12 hari.

Pengambilan titik pengamatan pada penelitian ini diharapkan dapat menggambarkan efek paparan terhadap spermatogonia yang telah memasuki spermatogenesis, yaitu 12 hari perlakuan (pengamatan dilakukan pada hari ke-13), efek terhadap spermatogonia yang belum memasuki spermatogenesis selama 4 siklus (pengamatan dilakukan pada hari ke 61) serta efek terhadap spermatogonia yang telah memasuki spermatogenesis setelah paparan berhenti (pengamatan dilakukan pada hari ke 73). Hasil penelitian menunjukkan bahwa efek paparan ekstrak kunyit menunjukkan perbedaan bermakna pada pengamatan hari ke 13, 61, namun tidak menunjukkan perbedaan bermakna pada hari ke-73. Hal tersebut sekaligus menggambarkan bahwa efek paparan kunyit mempengaruhi spermatogonia yang telah memasuki spermatogenesis, spermatogonia yang belum memasuki spermatogenesis, namun tidak mempengaruhi spermatogenesis spermatogonia yang tidak lagi terpapar ekstrak kunyit (pengamatan hari ke-73).

Proses spermatogenesis merupakan proses yang berlangsung melalui serangkaian

tahapan yang sangat terkoordinasi. Proses ini sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang mampu menembus system barrier pada jaringan penyusun testis (Johnson and Everitt, 1988). Bahan kimia yang mampu menembus system barrier dan mempengaruhi spermatogenesis adalah bahan kimia yang memiliki kelarutan tinggi terhadap lemak (Zenick and Clegg, 1989). Adanya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol maupun kelompok kontrol positif pada hasil penelitian ini, memberi bukti bahwa senyawa aktif dalam ekstrak kunyit mampu menembus sistem barrier sehingga mempengaruhi spermatogenesis.

Komponen utama rimpang kunyit adalah kurkuminoid, yang terdiri dari kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin (Atmadja *et al.*, 2002). Kurkuminoid memiliki beberapa efek farmakologi, yaitu antioksidan, antihepatotoksik, antiradang, antimemar, antimikrobia, antivirus, antiparasit, antimitagen serta antikanker (Rukmana, 1994). Efek antikanker yang ada dalam kurkuminoid ini diduga berperan dalam menekan terjadinya spermatogenesis sehingga jumlah spermatozoa menunjukkan perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan. Taylor dan Francis (2004) menyatakan bahwa aktivitas antikanker atau antitumor ini kemungkinan bekerja melalui mekanisme apoptosis. Melalui mekanisme ini diduga sel-sel spermatogonia yang telah memasuki spermatogenesis (pengamatan hari ke-13)

maupun yang belum memasuki spermatogenesis (pengamatan hari ke-61) masuk ke dalam jalur kematian sel yang terprogram sehingga jumlah spermatozoa lebih sedikit.

Spermatogenesis merupakan proses yang diregulasi oleh hormon reproduksi, yaitu gonadotrophin dan testoteron. Gonadotrophin maupun testoteron merupakan hormon yang memiliki waktu paruh beberapa hari sehingga apabila sediaan hormon ini diberikan pada hewan uji tetap dapat memunculkan pengaruh sampai beberapa saat setelah paparan dihentikan (Johnson and Everitt, 1995; Hafez and Hafez, 2000; Chedrese, 2009). Efek kurkumin diduga tidak mempengaruhi sistem hormon hewan uji sehingga efek paparan akan berhenti secara langsung setelah paparan dihentikan (pengamatan hari ke-73). Mekanisme aksi yang tidak mempengaruhi hormon reproduksi hewan uji menyebabkan perbedaan tidak bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol serta kelompok kontrol positif pada hari ke-12 setelah perlakuan dihentikan.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian serbuk rimpang kunyit dengan paparan kronis berpotensi menghambat spermatogenesis *Mus musculus*.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 1995. Anti – tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* 94(1) : 79 – 83.

- Atmadja, W. L., Y. Ito, G.L. Baker, and R.S. McCuskey, 2002. Effect of Curcuminoids As Antiinflammatory Agents on The Hepatic Microvascular Response to Endotoxin. *Shock*. 17 (5) : 399 – 403.
- Awasthi, S., S. K. Srivatara, J.T. Piper, S.S. Singhal, M. Chaubey dan Y.C. Awasthi, 1996. Induction of glutathione s – transferase activity by curcumin in mice. *Arzneimittelforschuns*. 42(7) : 962 – 964.
- Bryan, J,H,D., 1970. An eosin fast – green – naphtol yellow mixture differential staining of cytologic components in mammalian spermatozoa. *Stain. Techno*. 45 : 231-236.
- Carlson, B.M., 1988. Patten's Foundation of Embryology, 5th Ed. Mc Graw Hill Book Co. New York.
- Chedrese, P.J. 2009. Reproductive Endocrinology. A Molecular Approach. Springer. Pp. 35 – 53.
- Chateu, C. dan N. Boehm, 1995. Regulation of differentiation and ceratin 10 expression by all trans retinoic acid during oestrus cycle on the vaginal epithelium. *Cell Tissue. Res*. 284 : 373 – 381.
- Gunawan, D. 2002. Ramuan tradisional untuk keharmonisan suami istri. PT. Penebar Swadaya. Bogor.
- Hafez, B. and E.S.E. Hafez, 2000. Reproduction in Fram Animal. 7th Ed. South Carolina.
- Johnson, M.H & B.J. Everitt, 1995. Essential Reproduction. 3rd ed. Blackwell Sci. Publ. Oxford.
- Kuo, M.L., T.S. Huang dan J.K. Lin, 1996. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochem. Biophys. Acta – Molecular Basis of Disease*. 1317 (2) : 95 – 100.
- Laurence, D.R. & A.L. Bacharach, 1964. Evaluation of Drug Activities. Pharmacometrics
- Lin, J. K., T.S. Huang, C.A. Shih dan J.Y. Liu, 1994. Molecular mecanism of action of curcumin. *Food Phyto – Chemicals for Cancer Prevention II*. 547 : 196 – 203.
- Majeed, M., D. Laksmi dan B. Vladimir, 2001. Curcuminoid : Bioprotectant Compunds from turmeric. *J. Pharmacy & Pharmacology*. 56 (2) : 65 – 72.
- Mills, S. & K. Bone, 2000. Principles and practice of phytotherapy : Modern Herbal Medicine. Churchill Liveingstone. London.
- Munawar. 1995. Biometri II. Jurusan Biologi. FMIPA UNSRI. Palembang.
- Pan, M.H., T.M. Huang dan J.K. Lin, 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucoronidation in mice. *Drug. Metab. Dispos*. 27 : 486 – 494.
- Ruby, A.J., 1995. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett*. 94 : 79 – 83.
- Rukmana, R., 1994. Kunyit. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Sreejayan, M.N.A., 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharmacy Pharmacology*. 49 (1) : 105 – 107.
- Santoso, S., 1999. SPSS (Statistical Product and Service Solution). PT Elex Media Komputindo. pp 300 – 380. Jakarta.
- Taylor and Francis, 2004. Mechanism of Naringenin-induced Apoptotic Cascade In Cancer Cells : Involvement of Estrogen Receptor α and β Signalling. <http://pepublishing.metapress.com> (23 Juni 2006).
- Usman, H. & R.P.S. Akbar, 1995. Pengantar Statistika. Bumi Aksara. Jakarta.
- Whitten, P.L., C. Lewis, F. Russell dan F. Naftolin, 1995. Phytoestrogen influence on the development of behavior and gonadotrophin function . *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 208 (1) : 82-86
- WHO. 1999. Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm- cervical mucus interaction. 4th Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Zenic, H. and E.D. Clegg, 1989. Assesment of Reproductive Toxicology : A Risk Assesment Approach. In : Principles and Method of Toxicology. 2nd Ed. Raven Press, Ltd. New York.

