

PENGARUH PAPARAN KEBISINGAN TERHADAP JUMLAH SPERMATOZOA MENCIT JANTAN (*Mus musculus L*) YANG DIBERIKAN EKSTRAK BIJI ANGGUR (*Vitis vinifera L.*)

Ghestiara Pusphita Hannum¹, Yudhi Nugraha², Mila Citrawati³

¹Program Studi Sarjana Kedokteran, FK UPN “Veteran” Jakarta

²Departemen Biologi Molekuler, FK UPN “Veteran” Jakarta

³Departemen Fisiologi, FK UPN “Veteran” Jakarta

Jl. RS Fatmawati, Pondok Labu, Jakarta Selatan 12450, Telp. (021) 7656971

E-mail : ghestiara.siregar@yahoo.co.id

ABSTRAK

Kebisingan yang melebihi nilai ambang batas dan dipaparkan secara terus menerus dapat berdampak pada perubahan sistem hormon laki-laki, terbentuknya stress oksidatif, dan gangguan jumlah spermatozoa. Kondisi tersebut dapat diperbaiki dengan penggunaan antioksidan. Biji anggur adalah salah satu antioksidan yang mengandung komponen fenol yang memiliki senyawa resveratrol. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh paparan kebisingan terhadap jumlah spermatozoa mencit jantan yang diberikan ekstrak biji anggur. Penelitian ini menggunakan *post test only control group*, subjek penelitian ialah 30 mencit jantan galur Swiss Webster terbagi atas 5 kelompok: kelompok A (kontrol perlakuan) tidak diberi paparan kebisingan dan tidak diberi ekstrak biji anggur, kelompok B (kontrol negatif) tidak diberi paparan kebisingan dan diberi ekstrak biji anggur, kelompok C, D, E (kelompok perlakuan) diberi paparan kebisingan dengan intensitas yaitu 65 dB, 85 dB, 105 dB. Perlakuan diberi selama 33 hari. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan kebisingan dengan intensitas berbeda 65 dB, 85 dB, 105 dB dapat menurunkan jumlah spermatozoa mencit jantan galur Swiss Webster yang diberikan ekstrak biji buah anggur. Hasil penelitian menggunakan uji *One Way Anova* dengan nilai $p < 0.001$. Kesimpulan: Terdapat perbedaan antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pemberian paparan kebisingan dengan nilai di atas ambang batas dapat menurunkan jumlah spermatozoa mencit jantan galur Swiss Webster yang diberikan ekstrak biji buah anggur

Kata kunci: Ekstrak biji buah anggur (*Vitis vinifera L.*), Jumlah spermatozoa, Kebisingan

ABSTRACT

Noises exposure excessive and continuously changes the male hormone system which leads to formation of oxidative stress, and resulted in disrupt of semen quality. This condition can be reduced by the use of antioxidant. Grape seed is one of the antioxidants that contain phenol components that have Resveratrol compounds. This research aimed to observe the effect of noise exposure on the amount of spermatozoa of male mice given grape seed extract. This study used a post-test only control group, the research subjects were 30 male *Mus musculus L.* (Swiss Webster) mice divided into 5 groups: group A (treatment control) was not given noise exposure and was not given grape seed extract, group B (negative control) was not given noise exposure and was given grape seed extract, groups C, D, E (treatment group) were given noise exposure with sequential intensities of 65 dB, 85 dB, 105 dB. The treatment was given for 33 days. The results show that noise exposure with different intensities of 65 dB, 85 dB, 105 dB reduce the spermatozoa count of male Swiss Webster mice although with administration of grape seed extract. One Way Anova test was used for the result of this study, with p -value of 0.001. Conclusion: There are differences between the control group and treatment group. Provision of noise exposure with a value above the threshold limit reduce the amount of male Swiss Webster mice spermatozoa given with grape seed extract.

Keywords: Grape Seed Extract (*Vitis vinifera L.*), Amount of Spermatozoa, Noise

PENDAHULUAN

Infertilitas adalah suatu ketidakmampuan pada pasangan aktif secara seksual tanpa kontrasepsi untuk mendapatkan kehamilan dalam jangka waktu satu tahun.¹ Faktor infertilitas pada laki – laki ditemukan pada 50% pasangan yang tidak memiliki anak bersama dengan terjadinya kejadian abnormalitas pemeriksaan cairan semen (Duarsa dkk, 2015). Infertilitas tahun 2013 terdapat 30 – 40% kasus infertilitas banyak terjadi pada laki – laki.²

Kesuburan laki – laki dapat dinilai dari kualitas dan kuantitas pada spermatozoa terdiri dari jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa. Spermatozoa adalah sel yang dihasilkan oleh fungsi reproduksi seksual pada laki – laki. Proses spermatogenesis terjadi di dalam tubulus seminiferous yang dindingnya mengandung banyak sel germinal dan sel Sertoli. Satu siklus spermatogenesis memerlukan waktu 64 hari.²

Infertilitas laki-laki dapat disebabkan adanya gangguan fungsi endokrin karena respon tubuh terhadap faktor penyebab penurunan kuantitas dan kualitas spermatozoa seperti polusi lingkungan, stress, dan radikal bebas.² Stres psikologis dapat mengakibatkan terjadinya hambatan di hipotalamus yang dapat mengganggu hormonal, sehingga sel Leydig terhambat untuk menyekresi hormon testosterone.³

Hal – hal yang dapat menyebabkan terjadinya stress psikologik di antaranya adalah suhu, obat, paparan terhadap polutan dan radiasi, alkohol, hormon dan paparan kebisingan yang melebihi nilai ambang batas.³ Pada penelitian digunakan salah satu variabel stres psikologik yaitu paparan kebisingan yang melebihi nilai ambang.

Bising adalah bunyi yang menyebabkan terganggunya pekerja dalam hal performa kerja, fisiologis dan psikologis, pendengaran dan komunikasi, kelelahan sampai stress.⁴ Penelitian ini dilakukan pada mencit jantan (*Mus musculus L*) karena mencit merupakan hewan yang memiliki bentuk anatomi spermatozoa yang hampir menyerupai spermatozoa manusia, mencit juga mampu beradaptasi dengan mudah, dan memiliki siklus spermatogenesis yang lebih cepat dibandingkan tikus jantan (*Rattus norvegicus*) yaitu sekitar 32 hari.⁵

Terdapat beberapa cara ataupun bahan yang dapat meredam efek negatif paparan kebisingan terhadap penurunan kualitas sperma, salah satunya dengan pemberian antioksidan yang diharapkan mampu menurunkan stress oksidatif terhadap sperma. Senyawa antioksidan yang memiliki

efektivitas tinggi untuk menekan efek negatif penurunan kualitas sperma salah satunya adalah biji buah anggur.⁶

Buah anggur mengandung fenol yang memiliki manfaat sebagai penghambat pertumbuhan sel tumor, antikanker, antiaging, antiinflamasi, antimikroba, mengurangi risiko penyakit jantung dan sebagai antioksidan yang berperan dalam menstimulasi hormon androgen (testosteron) pada sel Leydig sehingga mampu menghasilkan proses spermatogenesis yang normal. Fenol pada biji anggur memiliki tingkat antioksidan 20 kali lebih besar dari vitamin E dan 50 kali lebih besar dari vitamin C.⁶

Berdasarkan uraian tersebut, maka peneliti tertarik melakukan penelitian eksperimen untuk menguji Pengaruh Paparan Kebisingan terhadap Jumlah Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus L*) yang diberikan Ekstrak Biji Anggur (*Vitis vinifera L.*)

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan melakukan percobaan yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan atau percobaan. Rancangan yang digunakan adalah rancangan *post-test* dengan kelompok kontrol (*post-test only control group design*). Karena dilakukan pengelompokan anggota kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Tidak dilakukan pretest tetapi hanya dilakukan *post-test* pada penelitian ini dengan membandingkan hasil dari masing – masing kelompok yang diteliti.

Bahan Penelitian

Aquades, Makanan mencit, Estrak biji anggur (*Vitis vinifera L*) 30 mg, NaCl 0.9%, Larutan *George* 0.5 ml, Ketamine.

Alat Penelitian

Kandang mencit, Ruang kedap suara, Tempat makan dan minum mencit, Pipet mikro, Timbangan analitik, Alat hitung (*improved neubauer*), Peralatan bedah minor, Gelas arloji, Sarung tangan, Sonde lambung, *Sound system*, Sound Level Meter.

Cara Kerja

Menyiapkan mencit jenis swiss webster jantan umur 6-12 minggu, lalu memilih mencit sesuai kriteria inklusi yaitu diukur berat badan mencit (20-40 gr), suhu, pernapasan, denyut jantung harus dalam batas normal untuk

memastikan mencit dalam keadaan sehat. Kemudian membagi mencit menjadi 5 kelompok, yaitu 3 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol perlakuan, dan 1 kelompok kontrol negatif. Lakukan penyesuaian atau adaptasi lingkungan selama 7 hari dan diberi makan minum dua hari sekali.

Setelah itu lakukan pengukuran berat badan mencit sebelum diberi perlakuan dengan timbangan analitik. Kemudian siapkan *sound system* di ruangan kedap suara, sonde lambung, dan ekstrak biji anggur. Letakkan masing – masing mencit kelompok perlakuan ke 3 ruang test (ruangan kedap suara).

Sebelum diberikan paparan kebisingan, berikan pada empat kelompok perlakuan ekstrak biji anggur dengan dosis 30 mg menggunakan sonde lambung pada kelompok eksperimen mencit selama 32 hari.

Lalu beri paparan kebisingan pada tiga kelompok perlakuan menggunakan *sound system* dengan intensitas kebisingan yang berbeda yaitu 65 dB, 85 dB dan 105 dB selama 8 jam/hari dan satu kelompok perlakuan tanpa menggunakan paparan kebisingan.

Sesuaikan kebisingan dengan menggunakan alat *sound level meter*. Untuk memastikan tiap kelompok variabel mendapatkan paparan kebisingan yang berbeda. Suara yang akan dipaparkan menggunakan rekaman suara yang kita sudah rekam yaitu suara trompet. Kemudian memberi perlakuan paparan kebisingan dengan intensitas yang berbeda pada mencit kelompok perlakuan selama 8 jam, mulai dari jam 08.00 – 16.00 wib setiap hari selama 32 hari.

Setelah perlakuan telah selesai, maka ditimbang berat badan mencit sebelum dilakukan pembedahan. Proses pembedahan diawali dengan penyuntikkan menggunakan ketamine. Lalu mengambil spermatozoa dari epididimis cauda mencit jantan yang telah dibedah dan dipotong secara *crosssectional* sehalus hingga beberapa bagian kecil, kemudian dilanjutkan dengan mengambil spermatozoa pada vas deferens dengan cara memijat vas deferens yang telah dipotong.

Lalu tampung hasil pembedahan di gelas arloji yang berisikan larutan NaCl 0.9% dan aduk hingga merata. Kemudian hitung jumlah spermatozoa dengan sperma yang telah diaduk secara merata. Diawali dengan ditambahkan larutan *George* 0.5 ml. Kemudian teteskan di atas kotak kamar hitung *improved newbauer*, lalu lihat di bawah mikroskop dan dihitung menggunakan *stopwatch*. Hitung jumlah spermatozoa pada 32 kotak besar pada *improved neubaue*. Setelah

pembedahan selesai lakukan penguburan pada mencit.

Analisis Data

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan metode analitik dengan uji parametrik *One-Way ANOVA* dan dilanjutkan uji post-hoc menggunakan uji *Bonferroni* karena memiliki distribusi data normal dan variasi data homogen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Infertilitas adalah ketidakmampuan pasangan yang aktif secara seksual tanpa kontrasepsi untuk mendapatkan kehamilan dalam satu tahun. Faktor infertilitas pada laki – laki ditemukan pada 50% pasangan yang tidak memiliki anak bersama dengan terjadinya kejadian abnormalitas pemeriksaan cairan semen (Duarsa dkk, 2015). Infertilitas tahun 2013 terdapat 30 – 40% kasus infertilitas banyak terjadi pada laki – laki.²

Kuantitas dan kualitas sperma berperan besar dalam kesuburan. Laki – laki dianggap infertil secara klinis jika konsentrasi spermanya turun di bawah 20 juta/ml semen. Meskipun hanya 1 sperma yang membuahi ovum, namun diperlukan banyak sperma penyerta untuk menghasilkan enzim akrosom yang layak untuk menguraikan sawar yang mengelilingi ovum sampai sperma berhasil menembus sitoplasma ovum. Banyak faktor yang mengakibatkan terjadinya penurunan kesuburan di antaranya adalah suhu, obat, paparan terhadap polutan dan radiasi, alkohol, hormon dan paparan kebisingan yang melebihi nilai ambang batas.³

Terdapat beberapa cara ataupun bahan yang mampu meredam efek negatif paparan kebisingan terhadap penurunan kualitas sperma, salah satunya dengan pemberian antioksidan yang diharapkan mampu menurunkan stress oksidatif terhadap sperma, contohnya buah anggur. Buah anggur mengandung fenol dan resveratrol yang memiliki manfaat sebagai penghambat pertumbuhan sel tumor, *antiaging*, antiinflamasi, antimikroba, mengurangi risiko penyakit jantung dan sebagai antioksidan yang berperan dalam menstimulasi hormon androgen (testosteron) pada sel Leydig sehingga mampu menghasilkan proses spermatogenesis yang lebih baik. Bagian buah anggur yang paling banyak mengandung senyawa resveratrol adalah biji buah anggur.³

Organ sistem reproduksi laki – laki terdiri dari genitalia interna dan eksterna. Pada organ testis, kelenjar aksesorius (prostat, vesikula seminalis, dan kelenjar bulbouretra), dan sistem duktus (vas deferens, duktus ejakulatorius,

epididymis, dan uretra) termasuk bagian dari genitalia interna. Sedangkan genitalia eksterna terdiri dari struktur lainnya, skrotum, penis, dan uretra.⁸

Organ sistem reproduksi laki – laki sangat di pengaruhi oleh aktivitas hormon dimana hormone ini sangat berpengaruh pada proses spermatogenesis. Umumnya, kadar FSH berkorelasi dengan jumlah spermatogonium. Ketika spermatogonium berkurang, nilai FSH biasanya meningkat, ketika jumlah spermatogonium adalah normal, tetapi pematangan ada pada spermatosit atau spermatid tinggi, nilai FSH berada dalam kisaran normal.⁹

Gangguan pada hormon dapat mengakibatkan hambatan proses pada hipotalamus dan terjadinya kegagalan pada sel Leydig dalam menyekresi hormon testosteron. Akibat penurunan testosteron dapat membuat gangguan dalam proses pematangan spermatozoa di epididimis, terutama gangguan dalam proses glikolisis. Proses glikolisis akan membentuk energi berupa *Adenosin Tri Phosphat* (ATP). ATP berperan sebagai sumber energi dan untuk mempertahankan hidup spermatozoa.¹⁰

Pengaruh stres terhadap infertilitas individu perlu diperhitungkan. Laki-laki di bawah tekanan stres, dalam pemeriksaan cairan semen dapat menunjukkan penurunan yang signifikan pada spermatozoa. Hal ini dikaitkan dengan penurunan hormon testosteron sehingga menimbulkan kegagalan spermatogenesis dan akhirnya berpengaruh pada parameter spermatozoa.¹¹

Paparan stress yang diberikan secara terus-menerus akan meningkatkan produksi ROS yang berlebih, hal ini mampu merusak genom mitokondria spermatozoa sehingga produksi energi terganggu dan memengaruhi motilitas spermatozoa serta merusak DNA sperma sehingga spermatozoa normal yang berada di sel germinal testis mengalami apoptosis.¹² Tetapi apabila apoptosis terjadi secara tidak sempurna maka dapat menimbulkan berbagai kerugian. Apoptosis yang terjadi pada sel germinal akan berpengaruh terhadap penurunan jumlah spermatozoa.¹³

Tabel 1. Rata-rata jumlah spermatozoa Mencit

Kelompok	Perlakuan	Rata- Rata Jumlah Spermatozoa (x 10 ⁶ sperma)
Kelompok A (K.A)	Tidak diberikan paparan kebisingan dan tidak diberikan ekstrak biji buah anggur 30 mg (kontrol perlakuan)	940.00
Kelompok B (K.B)	Tidak diberikan paparan kebisingan dan diberikan ekstrak biji buah anggur 30 mg (kontrol negatif)	1066.67
Kelompok C (K.C)	Intensitas bising 65 dB dan diberikan ekstrak biji buah anggur 30 mg	626.67
Kelompok D (K.D)	Intensitas bising 85 dB dan diberikan ekstrak biji buah anggur 30 mg	523.33
Kelompok E (K.E)	Intensitas bising 105 dB dan diberikan ekstrak biji buah anggur 30 mg	360.00

Stressor yang dipaparkan terus-menerus dapat menimbulkan radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan sehingga terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan ROS. Jumlah ROS yang meningkat seiring dengan peningkatan kortisol selama pemaparan stressor terus – menerus dapat menimbulkan stres oksidatif yang dampaknya pada spermatozoa menimbulkan kerusakan DNA, kerusakan membran plasma spermatozoa, menurunkan motilitas, dan menurunkan fungsi sperma yang dapat menimbulkan infertilitas.¹⁴

Jumlah spermatozoa normal adalah 20 juta sperma/ml cairan semen atau jumlah spermatozoa total adalah 39 juta/ejakulasi. Apabila jumlahnya < 20 juta sperma/ml disebut oligozoospermia. Ketiadaan spermatozoa dalam cairan semen disebut azoospermia yang dapat terjadi dikarenakan adanya gangguan spermatogenesis, disfungsi ejakulasi, ataupun karena adanya obstruksi saluran reproduksi laki-laki.¹⁵

Pada penelitian ini jumlah spermatozoa mengalami penurunan setelah dipaparkan kebisingan akhirnya menimbulkan terjadinya aktivasi sistem endokrin pada hipotalamus hipofisis – adrenal. Sehingga terjadi hambatan pengeluaran neurohormon CRH yang membuat penurunan pada jumlah sel spermatogoni

Hal tersebut terjadi akibat menurunnya sekresi LH, FSH dan testosteron. Kurangnya tiga hal tersebut dapat membuat hambatan pada proses proliferasi spermatogonium secara langsung dan akhirnya mengganggu proses spermatogenesis. Spermatogenesis merupakan proses yang terdiri dari proliferasi, diferensiasi dan pematangan sel spermatogenik. Sehingga jika terjadi gangguan pada salah satu tahap, maka dapat mempengaruhi proses yang berikutnya.³

Sekresi FSH yang terhambat akan mengakibatkan terganggunya fungsi sel Sertoli yang menyebabkan terganggunya proses metabolisme yang berakibat kematian pada spermatozoa. Hal ini disebabkan sel Sertoli memiliki fungsi sebagai pengatur, penunjang, dan pelindung bagi spermatozoa yang berkembang. Semakin lama waktu paparan kebisingan yang diberikan pada mencit, semakin menurunkan rata-rata jumlah spermatozoa hidup. Hal ini menunjukkan terjadi peningkatan abnormalitas spermatozoa akibat paparan kebisingan sehingga mampu menyebabkan terjadinya infertilitas.¹⁰

Kandungan fenol dan flavonoid pada ekstrak buah mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga dapat dipergunakan sebagai antioksidan alami, sehingga mampu meredam efek negatif dari paparan kebisingan yang mampu membuat penurunan jumlah spermatozoa.¹¹ Biji anggur mengandung *polyphenol* terutama *Oligomeric Proanthocyanidin Complex* (OPC) berdasarkan penelitian sebelumnya, yang memiliki kekuatan 20 kali lipat lebih baik dibanding vitamin E, dan 50 kali lipat dari vitamin C. Selain itu OPC yang memiliki efek proteksi radikal bebas, lipid peroksidasi dan kerusakan DNA lebih kuat dibanding vitamin C, E, dan beta-karotene.⁶

Oligomeric Proanthocyanidin Complex (OPC) terdiri salah satu dari resveratrol yang memiliki efek terhadap produksi testosteron yang dapat menekan proliferasi sel, memiliki efek penghambat pertumbuhan sel berlebih, mempotensi efek apoptosis yang terjadi dan sebagai agen kemoterapi. Selain itu kandungan pada resveratrol memiliki efek dalam merangsang produksi testosteron pada sel Leydig. Sehingga hal ini menguatkan penelitian bahwa biji anggur dapat menekan efek negatif dari stress oksidatif.¹⁷

Penilaian jumlah spermatozoa tidaklah cukup untuk mendiagnosis, begitu juga pada hewan eksperimen tikus ataupun mencit. Jika jumlah spermatozoa normal tetapi memiliki

penilaian pada morfologi dan motilitas yang tidak baik, dapat mengakibatkan terjadinya infertil pada laki-laki. Sebaliknya, jika jumlah spermatozoa sedikit tetapi memiliki penilaian morfologi dan motilitas yang baik maka seseorang dapat dikatakan fertil walaupun tidak sempurna.¹⁸

KESIMPULAN

Terdapat penurunan jumlah spermatozoa pada kelompok perlakuan yang diberikan paparan kebisingan. Semakin tinggi intensitas paparan kebisingan, semakin menurun jumlah spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) yang diberikan ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera L.*) 30 mg dan terdapat peningkatan jumlah spermatozoa pada kelompok dengan pemberian ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera L.*) 30 mg tanpa paparan kebisingan.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization [WHO]. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. PLoS Med [internet]. 2012;9(12):1–12. Available from: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001356>
2. Konsensus PI. Konsensus Penanganan Infertilitas. Himpun Endokrinol Reproduksi dan Fertilitas Indones (HIFERI), Perhimpunan Fertilitas Vitro Indones (PERFITRI), Ikatan Ahli Urologi Indones (IAUI), Perkumpulan Obstet dan Ginekologi Indones (IAUI), Perkumpulan Obstet dan Ginekologi Indones (IAUI) [internet]. 2013. Available from: http://labcito.co.id/wp-content/uploads/2015/ref/ref/Konsensus_Infertilitas_Revisi_9-1.pdf
3. Erris, Harahap I. Pengaruh Kebisingan terhadap Kuantitas dan Kualitas Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Dewasa. Media Litbangkes [internet]. 2015;24(3):123–8. Available from: <http://ejournal.litbang.depkes.go.id/index.php/MPK/article/view/3646>
4. Cahyani AA. Pengaruh Kebisingan Lingkungan Kerja terhadap Produktivitas Tenaga Kerja Karyawan Dinas Kesehatan Kab. Sidoarjo. Muhammadiyah Univ Gresik Repos [internet]. 2019;2(5):255. Available from: <http://eprints.umg.ac.id/3160/>

5. Musser G. The IUCN Red List of Threatened Species *Mus Musculus*. Int Union Conserv Nature, Switz. 2017;527–562.
6. Perdana VP. Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Anggur Hijau (*Vitis Vinifera*) terhadap Gambaran Histopatologi Diberi Paparan Asap Rokok Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Yang Dan Profil Protein Trachea Pada. Repos Univ Brawijaya [internet]. 2017;(February 2019):1–13. Available from: <http://repository.ub.ac.id/127303/>
7. Dahlan MS. Langkah-Langkah Membuat Proposal Penelitian Bidang Kedokteran dan Kesehatan. 2nd ed. Jakarta: Sagung Seto; 2011.
8. Varghese A, Deepinder F, Chandra A, Jeat AW, Pathan F, Agarwal A. Male Reproductive System Anatomy and Physiology. J World Mens Heal [internet]. 2014;32(1):1–12. Available from: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4939-1040-3>
9. Saito K, Suzuki K, Iwasaki A, Yumura Y, Kubota Y. Sperm Cryopreservation Before Cancer Chemotherapy Helps in The Emotional Battle Against Cancer. Cancer, Am Cancer Soc [internet]. 2005;104(3):521–4. Available from <https://doi.org/10.1002/cncr.21185%0A%0A>
10. Munandar A, Nurcahyani N, Busman H. Pengaruh Kebisingan Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus L.*). Vol. 5, Seminar Nasional Sains & Teknologi V Lembaga Penelitian Universitas Lampung [internet]. 2013. Available from: <http://repository.lppm.unila.ac.id/13469/1/25>. Prosiding Saintek V Aris Munandar 2013.pdf
11. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA Damage Measured by Comet Assay Methods in Molecular Biology. Spermatogenesis [internet]. 2013;927:137–46. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-038-0_13
12. Haque O, Vitale JA, Agarwal A, Ples SS dusis. The Effect of Smoking on Male Infertility. Male Infertil [internet]. 2014;19–30. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4939-1040-3_2
13. Campbell NA. Campbell Biology. 11th ed. Jakarta: Penerbit Erlangga; 2015.
14. Kageyama K. Regulation of Gonadotropins by Corticotropin-Releasing Factor and Urocortin. Front Endocrinol (Lausanne) [internet]. 2013;4(12):1–7. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/5b68/addfe426fc1502d0e038ba2b6c0c03bb3c0c.pdf%0A%0A>
15. World Health Organization [WHO]. WHO Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen Fifth Edition [internet]. 2010; Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf;jsessionid=558241B3557B649EF8E19C674AE75557?sequence=1
16. Gerós H, Chaves MM, Delrot S. The Biochemistry of The Grape Berry. The Biochemistry of the Grape Berry. Portugal: Bentham Books; 2012.
17. Forgács Z, Somosy Z, Telbisz Á, Massányi P, Lukác N. Effect of Resveratrol on The Testosterone Production of Mouse Primary Leydig Cell Culture. J Natl Inst Chem Saf [internet]. 2017;1–7. Available from: https://pdfs.semanticscholar.org/7381/79a06b1f8e33a3be0fc3bd206fe2b9d29cab.pdf?_ga=2.49935590.1971154519.1566354837-821158891.1566354837
18. Jung A, Schuppe H. Infulence of Genital Heat Stress on Semen Quality in Humans. Andrologia [internet]. 2007;39:203–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0272.2007.00794.x>