

Penelitian

PENGARUH ISOFLAVON KEDELAI TERHADAP JUMLAH KECEPATAN DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH JANTAN (*RATTUS NORVEGICUS*)

Elvina Sari Sinaga

Dosen STIKes Widya Husada Medan

E-mail: elvinasarisinaga@yahoo.com

ABSTRACT

The cases of infertility have increased since several years. Many experts ensure the rate of infertility has increased up to 15-20 percent of the approximately 50 million couples in Indonesia. In fact, it is currently known that the abnormalities also happen to men contributed 30% and 20% due to the abnormalities of both couples. Recent study shows that the possible cause of infertility is the negative effect of plant on the reproductive function, one of which is the plant containing fitostrogen. Fitoestrogen can disturb the balance of the hormonal system of animals and humans. Soy Isoflavones is one group of phytoestrogens. The mechanism of biological action of estrogen acts as an estrogen agonist or antagonist. Isoflavones acts antagonistic when estrogen level is high, whereas isoflavones is agonists when estrogen level is low. This study aims at finding out the effect of soy isoflavones given on the quantity, speed and spermatozoa morphology of male white rats (*Rattus norvegicus*). This research approach is post test only control group design, treated to the male white rats weighing 150-250 gr. The sample consisted of 25 rats, which were divided into 5 groups: control group (K), treatment group of P1, P2, P3 and P4. The treatment groups were orally given a dose of isoflavones for each, 1.26mg/200grbb/day, 2.52mg/200grbb/day, 3.78mg/200grbb/day and 5.04mg/200grbb/day for 48 days. After 48 days of treatment, the rats were slaughtered and the quantity, speed and morphology spermatozoa were examined. Then, the results were analyzed by using One Way ANOVA and continued by multiple comparison test typed Bonferroni. The result of ANOVA test shows the average decrease of quantity and speed of white male rats (*Rattus norvegicus*) start from group P1,P2,P3 and P4 compared with control group which is p value 0,001 ($p < 0,05$). Then there is an average increase of abnormal spermatozoa of white male rats (*Rattus norvegicus*) which is p value 0,001 ($p < 0,005$). From the results, it is concluded that there is significant effect of soybean isoflavones to the decrease of white male rats (*Rattus noevigicus*) spermatozoa quantity and speed also the increase of its abnormal spermatozoa morphology male white rats (*Rattus norvegicus*).

Keywords: Soy Isoflavones; Quantity; Speed; Morphology; Spermatozoa.

ABSTRAK

Kasus infertilitas sejak beberapa tahun terakhir meningkat. Para ahli memastikan angka infertilitas telah meningkat mencapai 15-20 persen dari sekitar 50 juta pasangan di Indonesia. Saat ini diketahui kelainan pada pria memberikan kontribusi 30% dan 20% disebabkan kelainan kedua belah pihak pasangan. Hasil penelitian terkini kemungkinan penyebab infertilitas adalah efek yang merugikan dari tumbuhan terhadap fungsi reproduksi, salah satunya adalah tumbuhan yang mengandung fitoestrogen. Fitoestrogen dapat mengacaukan keseimbangan sistem hormon binatang maupun manusia. Isoflavon kedelai merupakan salah satu kelompok fitoestrogen. Mekanisme aksi biologis estrogen adalah bertindak sebagai estrogen agonis atau antagonis. Isoflavon bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi, sebaliknya isoflavon bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan metode pendekatan post test only control group design, terhadap tikus putih jantan dengan berat badan 150 – 250 gr. Sampel terdiri dari 25 ekor tikus yang dibagi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol (K), kelompok P1, P2, P3 dan P4. Kelompok perlakuan diberikan isoflavon dengan dosis masing masing 1,26mg/200grbb/hari; 2,52mg/200grbb/hari;

3,78mg/ 200grbb/hari dan 5,04mg/200grbb/hari diberikan peroral selama 48 hari. Setelah 48 hari perlakuan tikus di korbakan dan diperiksa jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa. Analisa data menggunakan uji One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Multiple Comparrison jenis Bonferroni Hasil uji ANOVA didapatkan penurunan rata-rata jumlah dan kecepatan spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) mulai dari kelompok P1,P2,P3 dan P4 dibanding dengan kelompok kontrol dengan nilai p value 0,001 ($p < 0,05$). Terjadi peningkatan rata-rata morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan, dengan nilai p value 0,001 ($p < 0,05$). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan terdapat pengaruh yang signifikan pemberian isoflavon kedelai terhadap penurunan jumlah spermatozoa, kecepatan spermatozoa dan peningkatan morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci: Isoflavon, Kedelai, Kecepatan, Morfologi, Spermatozoa, *Rattus Norvegicus*, Tikus Putih Jantan.

PENDAHULUAN

Kasus infertilitas sejak beberapa tahun terakhir meningkat. Dahulu perhatian terfokus hanya pada pihak wanita saja sebagai penyebab ketidaksuburan pasangan. Saat ini diketahui kelainan pada pria memberikan kontribusi 30% dan 20% disebabkan kelainan kedua belah pihak pasangan. Oleh karena itu, faktor pria atau suami memegang kontribusi 50% pada pasangan infertil atau dengan kata lain baik suami ataupun istri mempunyai kontribusi yang sama (Trilsky,2008). Infertilitas adalah pasangan yang menjalani hubungan seksual secara teratur tanpa perlindungan selama 12 bulan dan tidak terjadi kehamilan (Llewellyn,2001). Kini, para ahli memastikan angka infertilitas telah meningkat mencapai 15-20 persen dari sekitar 50 juta pasangan di Indonesia.

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mengungkapkan penyebab masalah infertilitas. Hasil penelitian terkini bahwa adanya kemungkinan efek yang merugikan dari toksin lingkungan, seperti dari tumbuhan terhadap fungsi reproduksi. Tumbuhan menghasilkan berbagai bahan untuk manusia, baik yang menguntungkan maupun yang merugikan. Salah satu bahan yang dapat merugikan adalah fitoestrogen. Fitoestrogen suatu senyawa yang banyak ditemukan di lingkungan sekitar dan diketahui dapat mengacaukan keseimbangan sistem hormon binatang maupun manusia (Gultekin dan Yildizz 2006, Atanassova dan Mc.Kinnel 2000). Pada tahun 1940, pertama kali disadari bahwa komponen yang berasal dari beberapa

tanaman mempunyai efek estrogenik (Karahalil, 2006). Domba-domba yang mengkonsumsi semanggi merah setiap harinya, mengalami sindrom infertilitas atau yang lebih dikenal dengan *clover disease*. Dalam daun semanggi ini terkandung banyak isoflavon formononetin dan biochanin A (Gultekin dan Yildiz, 2006).

Isoflavon merupakan salah satu kelompok fitoestrogen. Senyawa isoflavon terdistribusi secara luas pada berbagai bagian tanaman, baik pada bagian akar, batang daun, maupun buah. Tanaman golongan Leguminosae, khususnya pada tanaman kedelai mengandung senyawa isoflavon yang cukup tinggi. Bagian tanaman kedelai yang mengandung senyawa isoflavon lebih tinggi terdapat pada biji kedelai, khususnya pada bagian hipokotil (*germ*) yang akan tumbuh menjadi tanaman. Sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama dari tanaman (Hernawati, 2009).

Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2-4 mg/g kedelai. Senyawa isoflavon tersebut pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa ikatan glukosida (Synder dan Kwon,1987). Kedelai mengandung 12 macam isoflavon, yang terdapat dalam bentuk glukosida dan bentuk aglikon. Proses pencernaan atau fermentasi kedelai atau hidrolisis enzimatis akan melepaskan molekul gula dari isoflavon glikosida sehingga menghasilkan isoflavon aglikon (Muchtadi, 2010).

Kacang kedelai dikenal sebagai fitoestrogen karena struktur molekul isoflavon kedelai mirip dengan struktur molekul estrogen. Hal ini menyebabkan

isoflavon kedelai dapat berikatan dengan *Receptor Estrogen* (RE), namun afinitas RE ligan tersebut lebih rendah dibanding estrogen endogen sel epitel dari jaringan reproduksi seperti kelenjar susu, ovari dan testis. Mekanisme aksi biologis estrogen adalah kemampuannya untuk bertindak sebagai estrogen agonis yang dapat berikatan dengan RE dan menstimulasi respon estrogen, atau bertindak sebagai estrogen antagonis yang dapat berikatan dengan RE namun menghambat respon estrogen. Isoflavon bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi, sebaliknya isoflavon bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah (Robertson, 2000).

Berbagai penelitian yang berkaitan dengan terpaparnya fitoestrogen dalam tubuh hewan dan dampaknya terhadap reproduksi sudah banyak diteliti, baik pada hewan jantan maupun betina. Hasil penelitian menunjukkan pengaruh fitoestrogen terhadap fertilitas dan perkembangan hewan bervariasi, ada yang berdampak positif dan ada juga yang negatif. Hal tersebut disebabkan respon biologis fitoestrogen pada hewan bergantung pada faktor-faktor species, umur, jenis kelamin, dosis, cara pemberian dan metabolisme (Hernawati, 2009).

Puspasari (2007) dalam penelitiannya menemukan rerata morfologi spermatozoa abnormal paling rendah pada kelompok mencit yang tidak diberi ekstrak kedelai dan paling tinggi pada kelompok ekstrak kedelai 780mg/hari. Peningkatan abnormalitas ini disebabkan karena adanya fitoestrogen, terutama isoflavon yang terkandung didalam kedelai. Pemberian fitoestrogen dapat mengganggu jalannya spermatogenesis, karena fitoestrogen dapat menghambat kerja enzim 17- β hidroksis teroid oksidoreduktase, enzim yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron. Hambatan kerja dari enzim menyebabkan penurunan kadar testosteron serta hambatan pada perkembangan sistem saraf pusat dan gonadal. Efek antiandrogenik fitoestrogen juga dapat menghambat sekresi LH pada hipofisis, yang berakibat penurunan kadar sekresi testosteron pada sel Leydig.

Penelitian yang dilakukan oleh Astuti (2009) pemberian tepung kedelai kaya

isoflavon dengan dosis 3 mg/ekor/hari tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap konsentrasi spermatozoa dan perkembangan berat testis akan tetapi pada dosis 6mg/kg/hari akan menghambat perkembangan testis dan menyebabkan atrofi testis. Hal ini diduga adanya reaksi estrogen agonis pada dosis isoflavon tertinggi (6mg/ekor/hari) menyebabkan rusaknya struktur membran plasma mitokondria spermatozoa akibat proses oksidasi oleh radikal bebas sehingga menurunkan fungsi dan kualitas spermatozoa.

Pernyataan yang berbeda dinyatakan oleh *Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment*. Komite ini telah menyelidiki efek pemberian isoflavon, suatu fitoestrogen yang terdapat pada kedelai, terhadap kadar hormon seksual dan kualitas semen pria. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian suplemen isoflavon (40 mg/hari) selama 2 bulan terhadap pria *non-vegetarian* berusia 18-35 tahun tidak mempengaruhi kadar estradiol, testosteron, LH, FSH, volume semen, jumlah, motilitas, dan morfologi sperma, ataupun pada besar testis. (Hughes 2003). Pernyataan serupa juga dituliskan dalam sebuah kepustakaan, bahwa tidak ada pengaruh pemberian isoflavon pada hormon reproduksi pria, besar testis, maupun kualitas semen (Watanabe, 2006).

Berdasarkan latar belakang diatas terlihat dua pernyataan yang berbeda maka dianggap penting untuk meneliti sejauh mana "Pengaruh isoflavon kedelai terhadap jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*)".

Tahap pelaksanaan

- Larutan isoflavon kedelai diberikan secara oral dengan menggunakan semprit yang ujung jarumnya dibuat tumpul berbentuk sonde. Perlakuan diberikan pada masing-masing kelompok secara berulang dengan dosis 1,26 mg, 2,52 mg, 3,78 mg dan 5,04 mg selama 48 hari (selama satu tahap spermatogenesis tikus).
- Setelah hari ke-48 disiapkan untuk dilakukan pematangan batang otak, kemudian dilaparotomi dan selanjutnya

- dilakukan pemotongan terhadap vasdeferens masing – masing 2 cm
- c. Selanjutnya dilakukan pengambilan spermatozoa vas deferens dengan cara memijat vas deferens yang telah dipotong dan kemudian ditampung dengan menggunakan gelas arloji yang berisi larutan NaCl 0,9 %.

Pelaksanaan Penelitian

Tikus ditempatkan didalam kandang yang terbuat dari bahan plastik (ukuran 30 x 20 x10 cm) yang ditutup dengan kawat kasa. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap 3 hari. Cahaya ruangan dikontrol persis jam 12 terang (pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai pukul 06.00),sedangkan suhu kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Pakan (pelet) dan minum (air PAM) disuplai setiap hari. Persetujuan Ethical clearance dari Komisi Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Pengamatan Untuk Jumlah, Kecepatan dan Morfologi Spermatozoa

Setelah diberi perlakuan suplemen isoflavon kedelai selama 48 hari,masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dibedah. Kemudian dilakukan pengamatan sebagai berikut:

Pengambilan Sekresi Vas Deferens

Untuk mendapatkan sperma di dalam sekresi Vas deferens dilakukan menurut Suhadi dan Arsyad (1983) sebagai berikut : setelah 48 hari perlakuan masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dibedah.

Kemudian organ testis dikeluarkan beserta vas deferens . Vas deferens diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%. Membuat larutan stok dengan jalan meletakkan vas deferens dalam cawan petri yang berisi NaCl fisiologis 0,9% tersebut, disebut sebagai larutan stok yang digunakan untuk mengetahui kualitas dan kuantitas spermatozoa seperti dibawah ini (Soehadi dan Arsyad, 1983). Suspensi sperma dari Vas deferens yang telah diperoleh dapat

digunakan untuk pengamatan yang meliputi: jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa.

Menghitung Jumlah Spermatozoa

Sperma yang telah diaduk homogen dihisap dengan pipet eritrosit sebanyak 0,5 ml, selanjutnya ditambahkan larutan *George* 0,5 ml, setelah diaduk rata diteteskan diatas kotak kamar hitung *improved newbauer*, kemudian dilihat dibawah mikroskop dan dihitung menggunakan *stopwatch* jumlah spermatozoa pada 32 kotak besar pada *improved newbauer*. Selanjutnya teteskan sperma yang dicampur larutan fisiologis (NaCl 0,9 %), kemudian dihitung jumlah spermatozoa yang mati, setelah kedua hasil didapat maka dihitung jumlah spermatozoa yang mati oleh larutan *George* dikurang jumlah spermatozoa yang mati oleh larutan NaCl, setelah didapatkan hasil maka didapat jumlah motil spermatozoa, setelah itu dikalikan dengan 1 juta. Adapun yang biasa digunakan untuk satuan jumlah total spermatozoa adalah juta/ml.

Pemeriksaan Kecepatan Spermatozoa

Pemeriksaan dapat dilakukan sejalan dengan pemeriksaan jumlah total spermatozoa. Sperma diteteskan sebanyak 1 tetes diatas kamar hitung *Improved Neubauer*, kemudian lihat dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x. Hitung sebanyak 25 ekor. Hitung kecepatan pada bilik kecil dari garis ke garis (atas ke bawah atau kiri ke kanan) dengan gerakan lurus kedepan secara aktif dan lincah disertai gerak ekor yang teratur. Hitung dalam detik. Untuk mencari rata-rata kecepatan, hasil yang didapat dijumlahkan kemudian dibagi 25.

Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa

Dilakukan dengan cara ambil larutan stok sebanyak ± 5 mikro liter (ul) larutan stok. Kemudian teteskan pada kaca objek. Buat hapusan dengan cara mendorong larutan tersebut dengan kaca objek lain ke depan. Biarkan mengering, fiksasi dengan alkohol 70 %, biarkan mengering selama 15 menit. Beri pewarnaan giemsa 5 mikro liter (ul) (merck chemical Co, Jerman) dan dibiarkan

mengering selama 15 menit. Bilas dengan air mengalir dan dibiarkan kering.

Amati dibawah mikroskop cahaya dalam beberapa lapangan pandang terhadap sperma yang abnormal, dengan pembesaran 400 kali, kemudian dilakukan penghitungan jumlah morfologi spermatozoa normal dan abnormal. Ciri sperma normal mempunyai bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus, sedangkan sperma yang abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan, dapat berbentuk seperti pisang atau tidak beraturan (amorphous), atau terlalu bengkok, dan ekornya tidak lurus bahkan tidak berekor, atau hanya terdapat ekornya saja tanpa kepala. Hitung jumlah sperma terhadap keseluruhan total sperma yang terhitung dengan beberapa kali lapangan pandang (kriteria WHO minimal 5x lapangan pandang) (Tadjudin,1998).

HASIL

Jumlah Spermatozoa

Tabel 1. Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov Jumlah Spermatozoa (juta/ml) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus Norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai

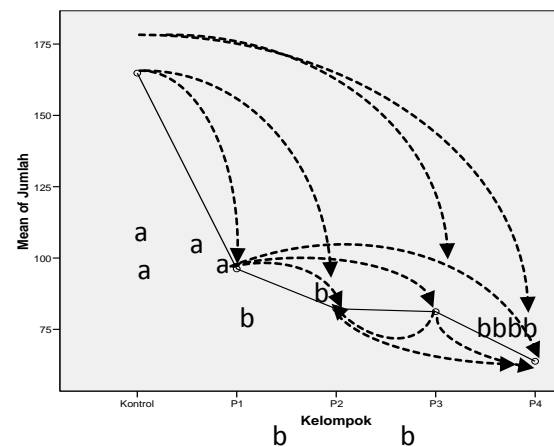
Jumlah Spermatozoa	
Mean	97,64
SD	39,90
<i>p</i>	0,059

Berdasarkan Tabel 1 didapatkan hasil uji normalitas dengan nilai *p* value sebesar 0,059 yang berarti data tersebut terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat adakah pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)

Tabel 2. Hasil Uji ANOVA terhadap Jumlah Spermatozoa (juta/ml) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai

Kelompok	Mean (juta/ml)	SD	<i>p</i>
Kontrol	164,80	40,40	0,001
P1	96,20	10,99	
P2	82,20	5,63	
P3	81,20	6,72	
P4	63,80	3,70	

Dari hasil uji ANOVA didapatkan penurunan rata-rata jumlah spermatozoa tikus putih jantan pada kelompok yang diberi isoflavon kedelai dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi isoflavon kedelai (kontrol) dan diperoleh nilai *p* value sebesar 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah spermatozoa. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *PostHocBonferroni*



Ket : a= $p < 0,05$ b= $p \geq 0,05$

Grafik 1. Hasil Uji Multiple Comparisons Bonferroni Jumlah spermatozoa (juta/ml) Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan yang telah Diberi Isoflavon.

Dari grafik 1 diketahui bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, kelompok kontrol dengan kelompok P2,

kelompok kontrol dengan kelompok P3, kelompok kontrol dengan P4 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Untuk antar kelompok perlakuan, kelompok P1 dengan kelompok P2, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P4, kelompok P3 dengan kelompok P4 tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$)

Kecepatan Spermatozoa

Tabel 3. Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov Kecepatan Spermatozoa (Detik) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus Norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai

Kecepatan Spermatozoa (detik)	
Mean	1,64
SD	0,47
<i>p</i>	0,43

Berdasarkan Tabel 3 didapatkan hasil uji normalitas dengan nilai *p* value sebesar 0,43 yang berarti data tersebut terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat adakah pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap kecepatan spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)

Tabel 4. Hasil Uji ANOVA terhadap Kecepatan Spermatozoa (Detik) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai

Kelompok	Mean	SD	<i>P</i>
	(detik)		
Kontrol	1,14	0,22	0,001
P1	1,26	0,15	
P2	1,52	0,24	
P3	2,11	0,1	
P4	2,18	0,17	

Dari tabel uji ANOVA didapatkan penurunan rata-rata kecepatan spermatozoa tikus putih jantan. Penurunan kecepatan spermatozoa tikus putih jantan mulai dari kelompok P1 sampai kelompok P4, nilai *p* value sebesar 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap kecepatan spermatozoa tikus putih jantan. Untuk melihat signifikansi antar

kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni*.

Tabel 5. Uji Multiple Comparisons Bonferroni terhadap Kecepatan Spermatozoa Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus Norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai

(I) Dosis perlakuan	(J) Dosis perlakuan	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	-0,12	1,000	-0,49	0,25
	P2	-0,38*	0,039	-0,75	-0,13
	P3	-0,97*	0,000	-1,35	-0,65
	P4	-1,04*	0,000	-1,41	-0,66
P1	P2	-0,26	0,357	-0,63	0,10
	P3	-0,85*	0,000	-1,23	-0,48
	P4	-0,92*	0,000	-1,29	-0,54
P2	P3	-0,59*	0,001	-0,96	-0,21
	P4	-0,65*	0,000	-1,02	-0,28
P3	P4	-0,62	1,000	-0,43	0,31

Hasil uji Multiple Comparisons (tabel 5.5) terlihat bahwa rata-rata kecepatan spermatozoa antara kontrol dengan P2, P3, dan P4 menunjukkan perbedaan kecepatan spermatozoa yang signifikan ($p < 0,05$), demikian juga untuk antar perlakuan yaitu : P1 dengan P3, P1 dengan P4, P2 dengan P3, P2 dengan P4 menunjukkan perbedaan kecepatan spermatozoa yang signifikan ($p < 0,05$), akan tetapi antara kontrol dengan P1, P1 dengan P2, P3 dengan P4 tidak menunjukkan perbedaan kecepatan spermatozoa yang signifikan ($p > 0,05$)

Morfologi Spermatozoa

Tabel 6. Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov Morfologi Abnormal Spermatozoa (%) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus Norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai

Morfologi Abnormal Spermatozoa (%)	
Mean	23,96
SD	9,78
<i>P</i>	0,97

Berdasarkan Tabel 3 didapatkan hasil uji normalitas nilai *p* value sebesar 0,97 yang berarti data tersebut terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat adakah pengaruh pemberian

isoflavon kedelai terhadap morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan.

Tabel 7. Hasil Uji ANOVA terhadap Morfologi Spermatozoa Abnormal (%) Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus Norvegicus*) setelah pemberian Isoflavon Kedelai

Kelompok	Mean (%)	SD	p
Kontrol	9,60	2,30	0,001
P1	22,20	4,21	
P2	26,00	2,65	
P3	29,20	9,78	
P4	31,40	9,02	

Dari tabel uji ANOVA didapatkan peningkatan rata-rata morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan. Peningkatan morfologi abnormal spermatozoa mulai dari kelompok P1 sampai kelompok P4, nilai p value sebesar 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap morfologi spermatozoa. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni*.

Tabel 8. Uji Multiple Comparisons Bonferroni terhadap Morfologi Spermatozoa Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus Norvegicus*) setelah Pemberian Isoflavon Kedelai

(I) Dosis perlakuan	(J) Dosis perlakuan	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	-14,00*	0,026	-26,84	-1,16
	P2	-16,40*	0,007	-29,24	-3,56
	P3	-19,60*	0,001	-32,44	-6,76
	P4	-21,80*	0,000	-34,64	-8,96
P1	P2	-2,40	1,000	-15,24	10,44
	P3	-5,60	1,000	-18,44	7,24
	P4	-7,80	0,697	-20,64	5,04
P2	P3	-3,20	1,000	-16,04	9,64
	P4	-5,40	1,000	-18,24	7,44
P3	P4	-2,20	1,000	-15,04	10,64

Hasil uji Multiple Comparisons (tabel 5.8) didapatkan, morfologi abnormal spermatozoa antara kelompok kontrol dengan kelompok P1,P2,P3 dan P4 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), tetapi untuk antar kelompok perlakuan yaitu : antara kelompok P1 dengan kelompok P2, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P1 dengan kelompok P4,

kelompok P2 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P4 dan kelompok P3 dengan kelompok P4 tidak menunjukkan perbedaan morfologi abnormal spermatozoa yang signifikan ($p > 0,05$)

PEMBAHASAN

Penelitian terkini mengungkapkan penyebab infertilitas adanya kemungkinan efek yang merugikan dari toksin lingkungan, seperti : tumbuhan yang dapat mempengaruhi sistem reproduksi. Tumbuhan menghasilkan berbagai bahan untuk manusia, baik yang menguntungkan maupun yang merugikan. Salah satu bahan yang dapat merugikan adalah : fitoestrogen. Isoflavon adalah merupakan salah satu kelompok fitoestrogen. (Attanassova 2000). Isoflavon banyak terdapat dalam kedelai. Kedelai mengandung 12 macam isoflavon yang terdapat dalam bentuk glukosida dan bentuk aglikon. Isoflavon utama yang terdapat dalam kedelai adalah: daidzein, genestein dan glisitein. Struktur molekul isoflavon kedelai mirip dengan struktur molekul estrogen. Hal ini menyebabkan isoflavon kedelai dapat berikatan dengan *Receptor Estrogen* (RE), namun afinitas RE ligan tersebut lebih rendah dibanding estrogen endogen sel epitel dari jaringan reproduksi seperti kelenjar susu, ovari dan testis.

Mekanisme aksi biologis estrogen adalah kemampuannya untuk bertindak sebagai estrogen agonis yang dapat berikatan dengan RE dan menstimulasi respon estrogen, atau bertindak sebagai estrogen antagonis yang dapat berikatan dengan RE namun menghambat respon estrogen. Isoflavon bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi, sebaliknya isoflavon bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah. (Robertson 2000).

Jumlah Spermatozoa Akibat Pemberian Isoflavon Kedelai

Dari hasil penelitian pada tabel 5.2 menunjukkan pemberian isoflavon kedelai memperlihatkan respon terhadap penurunan rata-rata jumlah spermatozoa tikus mulai dari kelompok P1 sampai dengan P4. Penurunan rata-rata jumlah spermatozoa tertinggi

terdapat pada kelompok P4 dengan dosis tertinggi (5,04 mg). Pada kelompok kontrol rata-rata jumlah spermatozoa adalah: 164,80 juta/ml, kemudian terjadi penurunan pada kelompok P1: 96,20 juta/ml, P2: 82,20 juta/ml, P3: 81,20 juta/ml dan P4: 63,80 juta/ml.

Secara statistik dengan menggunakan uji ANOVA diperoleh p value sebesar 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap jumlah spermatozoa. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan masing-masing kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni*.

Berdasarkan grafik 5.1. antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, kelompok kontrol dengan kelompok P2, kelompok kontrol dengan kelompok P3, kelompok kontrol dengan P4 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Untuk antar kelompok perlakuan, kelompok P1 dengan kelompok P2, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P1 dengan kelompok P4, kelompok P2 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P4, kelompok P3 dengan kelompok P4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$).

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

Penurunan jumlah spermatozoa setelah pemberian isoflavon kedelai diduga isoflavon bersifat estrogen agonis yang dapat berikatan dengan Receptor Estrogen (RE) dan menstimulasi respon estrogen sehingga dapat mengganggu jalannya spermatogenesis. Fitoestrogen dapat menghambat kerja enzim 17- β -hidroksisteroidoksireduktase, enzim yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron.

Hambatan kerja dari enzim menyebabkan penurunan kadar testosteron serta hambatan pada perkembangan sistem saraf pusat dan gonadal. Efek antiandrogenikfitoestrogen juga dapat menghambat sekresi LH pada hipofisis, yang berakibat penurunan kadar sekresi testosteron pada sel leydig (Gultekin, 2006).

Hormon testosteron sangat diperlukan untuk mengawali, mempertahankan proses spermatogenesis, serta mempertahankan kualitas spermatozoa hingga keluar dari tubuh. Penurunan kadar testosteron ini dapat menyebabkan proses spermatogenesis tidak berjalan optimal, yang pada akhirnya menurunkan kualitas spermatozoa, termasuk jumlah spermatozoa. (Matsumoto 2001). Jumlah spermatozoa yang dihasilkan testis tidak cukup untuk mendiagnosa fertil atau infertilitasnya seseorang. Karena adakalanya jumlah spermatozoa yang normal tetapi bila memiliki morfologi dan kecepatan yang kurang baik akan bisa menyebabkan infertil. Sebaliknya dengan jumlah spermatozoa yang sedikit tapi memiliki morfologi dan kecepatan normal maka masih bisa fertil (Guyton, 1997).

Kecepatan Spermatozoa Akibat Pemberian Isoflavon Kedelai

Kecepatan spermatozoa adalah waktu yang dibutuhkan untuk menempuh jarak tertentu oleh seekor spermatozoa yang mempunyai gerak aktif, progresif, dan lurus maju kedepan. Hasil penelitian dengan menggunakan uji statistik ANOVA diperoleh nilai p value sebesar 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap kecepatan spermatozoa. Rata-rata kecepatan spermatozoa kelompok perlakuan lebih lambat bila dibandingkan dengan kontrol (1,14/detik). Lebih lambatnya kecepatan spermatozoa sebanding dengan dosis isoflavon kedelai yang diberikan selama 48 hari. Semakin tinggi dosis isoflavon kedelai yang diberikan, semakin berkurang kecepatan spermatozoa. Penurunan kecepatan yang paling tinggi adalah pada kelompok P4 dengan pemberian isoflavon kedelai (5,04mg)

Kecepatan spermatozoa ditentukan oleh berbagai faktor diantaranya bentuk anatomi spermatozoa, metabolisme dan cairan semen.

Faktor inilah yang nantinya akan mempengaruhi gerakan spermatozoa sehingga dihasilkan suatu gerak yang aktif, progresif dan lurus kedepan. Gerakan spermatozoa normal berasal dari gerak kepala, leher dan ekor yang berirama teratur. Gerakan ini membutuhkan energi yang disuplai dari bagian tengah spermatozoa dan dialirkan ke ekor. Pada bagian itu terdapat mitokondria yang memecah bahan-bahan tertentu untuk mengeluarkan energi. Energi dibagian tengah disalurkan ke distal atau ekor, dan ekor kemudian bergerak. Energi yang keluar menyebabkan dua macam gerakan. Pertama gerakan bergelombang keujung ekor, kedua bersifat sirkular. Energi yang keujung ekor itu tidak lurus kebelakang, tetapi arahnya melingkari batang tubuh bagian tengah, terus keujung ekor (Hafes dkk, 2000).

Adenosin Tri Phospat (ATP) didapatkan dari enzymatic hidrolisis ATP dan menyebarkan gelombang ke flagella spermatozoa. Fosfatagen lainnya (fosfat berenergi tinggi) dalam sel sperma dapat bertindak sebagai cadangan pendukung. Sel-sel sperma mengandung sekitar 150 moles ATP dan 85 mole ADP ditambah sekitar 20 moles fruktosa 1,6 – diphosphate dan triose phosphate yang digabungkan. Fruktosa dihasilkan oleh kelenjer vesikula seminalis dan disekresikan pada plasma semen. Banyak asam dikarboxylyl, tricarboxylic dan asam lemak yang masuk ke dalam metabolisme sperma melalui siklus krebs (Hafes dkk, 2000).

Spermatozoa memiliki sistem pertahanan enzimatis atau non enzimatis untuk menetralkan pengaruh toksik senyawa ROS pada spermatozoa, sehingga ROS hanya terdapat dalam jumlah kecil yang diperlukan untuk menjaga fungsi spermatozoa tetap normal. Sistem pertahanan radikal bebas, baik enzimatis maupun non enzimatis, meliputi proteksi terhadap berbagai kompartemen sel antara lain mitokondria, retikulum endoplasma, peroksisom, sitoplasma dan membran sel. Pemeliharaan integritas sel tergantung pada keseimbangan antara pembentukan radikal bebas dengan sistem pertahanan radikal bebas. Terjadinya kerusakan sel dihasilkan oleh

ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan. (Astuti, 2009).

Penurunan kecepatan spermatozoa diduga isoflavon bersifat sebagai estrogen agonis dengan menstimulasi respon estrogen sehingga berpotensi menimbulkan gangguan, mengakibatkan rusaknya struktur membran plasma mitokondria spermatozoa akibat proses oksidasi radikal bebas dan menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid. Struktur internal mitokondria yang tidak sempurna sehingga mengakibatkan terganggunya proses metabolisme spermatozoa. Terbentuknya peroksidasi lipid berhubungan dengan peningkatan pembentukan radikal bebas dan berkorelasi dengan penurunan kecepatan spermatozoa, penurunan fosforilasi protein pada aksonem dan berkurangnya ATP intrasel. Ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (*scavenger*) dari isoflavon kedelai dapat mengakibatkan kerusakan sel spermatozoa terutama membran plasma mitokondria yang berperan dalam memproduksi energi dalam bentuk ATP, dimana ATP dibutuhkan untuk kontraksi/pergerakan spermatozoa.

Morfologi Spermatozoa Akibat Pemberian Isoflavon Kedelai

Dari hasil penelitian pada tabel 5.6 didapatkan bahwa pemberian isoflavon kedelai dengan beberapa dosis yang berbeda memperlihatkan respon terhadap peningkatan rata-rata morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan, dimana mulai dosis terendah perlakuan (P1) telah menunjukkan peningkatan rata-rata morfologi abnormal spermatozoa tikus. Peningkatan morfologi abnormal spermatozoa sebanding dengan tingkat dosis yang diberikan setiap hari selama 48 hari. Terlihat bahwa semakin tinggi dosis isoflavon kedelai yang diberikan maka semakin tinggi peningkatan morfologi abnormal spermatozoa yang terjadi. Pada kelompok kontrol rata-rata morfologi abnormal spermatozoa adalah 9,60%, kelompok P1 terjadi peningkatan menjadi 22,20%. Peningkatan terus terjadi pada

kelompok P2 : 26,00% , kelompok P3 : 29,20% dan pada kelompok P4 menjadi 31,40%.

Secara statistik dengan menggunakan menggunakan uji ANOVA diperoleh p value sebesar 0,001 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian isoflavon kedelai terhadap morfologi abnormal spermatozoa. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan masing-masing kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni*. Berdasarkan grafik 5.3. antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, kelompok kontrol dengan kelompok P2, kelompok kontrol dengan kelompok P3, kelompok kontrol dengan P4 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Untuk antar kelompok perlakuan, kelompok P1 dengan kelompok P2, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P1 dengan kelompok P4, kelompok P2 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P4, kelompok P3 dengan kelompok P4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$).

Meningkatnya bentuk spermatozoa yang abnormal dapat terjadi karena berbagai macam gangguan dalam proses spermatogenesis terutama pada tahap spermiogenesis. Gangguan ini bisa disebabkan oleh akibat hormonal, radikal bebas dan bahan kimia (Yatim, 1994). Spermatogenesis dapat terjadi melalui beberapa tahap pembelahan. Tahap awalnya spermatogonia akan mengalami perubahan menjadi spermatosit primer, kemudian menjadi spermatosit sekunder dan menjadi spermatid. Sebelum spermatid menjadi spermatozoa ada fase yang dilewati spermatid yang disebut fase spermiogenesis. Fase ini terdiri dari fase golgi, tutup, akrosom dan pematangan bertujuan untuk membentuk morfologi normal spermatozoa yang terdiri dari kepala, leher dan ekor yang normal (Rugh, 1997).

Peningkatan abnormalitas morfologi ini dapat disebabkan karena adanya fitoestrogen, terutama isoflavon yang banyak terkandung dalam kedelai. Pemberian fitoestrogen dapat mengganggu jalannya spermatogenesis, karena fitoestrogen menghambat kerja enzim

17- β -hidroksisteroidoksidoreduktase, enzim yang dibutuhkan untuk sintesis testosteron. Hambatan kerja enzim tersebut menyebabkan penurunan kadar testosteron serta hambatan pada perkembangan sistem saraf pusat dan gonadal (Karahalil 2006 dan Attanassova et.al 2000).

Efektandiandrogenik fitoestrogen juga dapat menghambat sekresi LH pada hipofisis, yang berakibat penurunan kadar sekresi testosteron pada sel leydig (Gultekin 2006). Hormon testosteron sangat diperlukan untuk mengawali, mempertahankan proses spermatogenesis, serta mempertahankan kualitas spermatozoa hingga dikeluarkan dari tubuh. Penurunan kadar testosteron inilah yang menyebabkan proses spermatogenesis tidak berjalan optimal, yang pada akhirnya menurunkan kualitas spermatozoa, termasuk morfologi spermatozoa (Glenn 1995 dan Matsumoto 2001).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian pengaruh isoflavon kedelai terhadap jumlah, kecepatan dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat pengaruh yang signifikan pemberian isoflavon kedelai terhadap penurunan jumlah spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*)
2. Terdapat pengaruh yang signifikan pemberian isoflavon kedelai terhadap penurunan kecepatan spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*)
3. Terdapat pengaruh yang signifikan pemberian isoflavon kedelai terhadap peningkatan morfologi abnormal spermatozoa tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*)

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, pembahasan dan kesimpulan diatas maka disarankan untuk peneliti selanjutnya agar:

1. Melakukan pemeriksaan lebih lanjut terhadap kadar hormon testosteron yang juga dapat berpengaruh terhadap kesuburan pria

2. Melakukan penelitian lebih lanjut terhadap histologi sel leydig, sel sertoli dan spermatogenesis
3. Melakukan penelitian tentang pengaruh isoflavon kedelai terhadap sistem reproduksi wanita.
4. Melakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh isoflavon kedelai terhadap sistem organ lain selain sistem reproduksi

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti S. (2009). *Kualitas Spermatozoa Tikus Jantan yang Diberi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon*. Lampung: Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
- Adiyono W. (2005). <http://w.w.w.suaramerdeka.com/harian/0503.28/ragam01htm>, dikutip tanggal 10 Maret 2011.
- Attanassova N, Mckinnel. (2000). *Comparative Effects Of Neonatal Exposure of Male Rats to Potent And Weak (Environmental) Estrogens On Spermatogenesis at Puberty and The Relationship to Adult Testis Size and Fertility: Evidence for Stimulatory Effects of Low Estrogen Levels*.
- Axelsson M, KDR Setchell. (1981). *The Excretion Of Lignans In Rats-Evidence For An Intestinal Bacterial Source For This New Group Of Compounds*. FEBS Lett,123:337-342.
- Budisantoso, Hieronymus. (1994). *Susu dan Yogurt Kedelai*. Yogyakarta: Kanisius.
- Brzozowski AM et al. (2002). *Molecular Basis Of Agonism And Antagonism In The Estrogen Receptor*. Nature (Lond),389:753-758.
- Cotroneo. (2001). *Sex Steroid Receptor Regulation By Genestein In The Pubertal Rat Uterus, Moll Cell Endocrinol*.
- Carnerro and Kelly. (1998). *Sistem Reproduksi Pria, dalam (Tambayong J, Alih Bahasa) Histology Dasar, Edisi ke-8*. Jakarta: EGC.
- Cunningham AR, Klopman G, Rosenkranz HS. (1997). *A Dichotomy In The Lipophilicity Of Natural Estrogens, Xenestrogens, And Phytoestrogens*. *Environ Health Perspect*. 105:665-668.
- Fritz WA. (2002). *Dietary Genistein Down-Regulates Androogen and Estrogen Receptor Expression in The Rat Prostate, Moll Cell Endocrinol Greenspan, Baxter, 1998*. *Endokrinologi Dasar dan Klinik*, Ed IV, alih bahasa Caroline Wujaya, maulany, Sonny Samsudin. Jakarta: EGC.
- Gultekin E, Yildiz F. (2006). *Introduction to Phytoestrogen, In : Yildiz F, Editor, Phytoestrogen in Functional food, Boca Raton*. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group LLC.
- Guyton, AC, Hall JE. (1997). *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9*. Jakarta: EGC.
- Glover A and Assinder S.J. (2006). *Acute Exposure Of Adult Male Rats To Dietary Phytoestrogen Reduces Fecundity And Alters Epididymal Steroid Hormon Receptor Expression*. *Jour.Endoc*.189: 565-573.
- Hugges I, Woods HF. (2003). *Phytoestrogen and Health*. London: Committe on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Product and The Environment.
- Hafez, E, S.E. (1996). *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. The Mosbyuni.
- Hess, R.A. (1999). *Spermatogenesis, Overview in Encyclopedia of Reproduction 4*: 539-545.
- Hernawati. (2009). *Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon Dari Tanaman Kedelai*. Bandung: Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Pendidikan Indonesia Bandung .
- Hawkesworth G, BS Drasar dan MJ Hill. (1971). *Intestinal Bacteria And The Hidrolysis Of Glisidic Bonds*. *J Med Microbiol*. 4:451-459.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. (1997). *Textbook of Basic Hystology. 8th ed=Histologi dasar Edisi 8*. Jakarta: EGC.
- Joannou GE et.al. (1995). *A Urinary Profil Study Of Dietary Phytoestrogens. The Indentification And Mode Of*

- Metabolism Of New Isoflavonoids. J Steroid Biochem Molec Biol*, 54:167-184.
- Kang KS, Che JH, and Lee YS. (2002). *Lack Of Adverse Effects In The F1 Offspring Maternally Exposed To Genistein At Human Intake Dose Level, Food Chem Toxicol*.
- Karahalil B. (2006). *Benefits And Risk Of Phytoestrogens*, In: Yildiz F, Editor, *Phytoestrogen In Functional Foods*, Boca Raton. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group LLC.
- Kim H, Peterson TG, Barnes S. (1998). *Mechanism Of Action Of The Soy Isoflavone Genistein : Emerging Role Of Its Effects Through Transforming Growth Factor Beta Signaling*. *Am J Clin Nutr*.68: 1418S-1425S.
- Ketaren, S. (1986). *Pengantar Teknologi Minyak Dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI Press.
- Kusumawati D. (2004). *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Khaidir M. (2006). *Studi Literatur Penilaian Tingkat Fertilitas dan Penatalaksanaannya Pada Pria*, *Jurnal Kesehatan Masyarakat*.
- King RA. (2002). *Soy Isoflavones In Foods: Processing Effects And Metabolism*. *ASA Tech Bull*,87 (10): 1-10.
- Leclerq G, Heuson JC. (1979). *Physiological And Pharmacological Effect Of Estrogen In Breast Cancer*. *Biochem Biophys Acta*.560:427-455.
- Llewellyn D. (2001). *Dasar-dasar Obstetri dan Ginekologi Ed VI*. Jakarta: Hipokrates.
- Matsumoto AM. The testis. (2001). In: Felig P, Frohman LA, editors. *Endocrinology and metabolism, 4th ed*. USA: The McGraw-Hill Companies Inc.: 635-58.
- Moeloe N. (1994). *Reproduksi dan Embriologi: dari Satu Sel Menjadi Organisme*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Muchtadi D. (2010). *Kedelai Komponen Bioktif untuk Kesehatan*. Bandung: Alfabeta.
- Nasution, A.W. (1993). *Biologi Kedokteran (Reproduksi)*. Padang: Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.
- Nasution, A.W. (1999). *Andrologi*. Padang: Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.
- Puspasari D. (2007). *Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Dosis Bertingkat Terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit Jantan Strain Balb/C*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Robertson KM, O'Donnell L, Simpson ER, Jones MEE. (2002). *The Phenotype Of Aromatase Knockout Mouse Reveals Dietary Phytoestrogens impact Significantly On Testis Fuction*. *Endocrinology*.
- Rugh. (1997). *The Mouse is Reproduction and Development* Mineopolis: Burgess.
- Rudolf Stromberg. (1986). *The Anatomy Of Laboratory Rat*. Baltimore: The Williams and Wilking Company.
- Budidaya Kedelai*. Bandung: Pustaka Buana. Hal 13-15.
- Saleh RA dan Agarwal A. (2002). *Oxidative Stress And Male Infertility: From Research Bench To Clinical Practice*. *J Androl*.23(6): 737-52 .
- Sanocka D dan Kurpisz M. (2004). *Reactive Oxygen Species and Sperm Cells*. *Reprod Biol Endocrinol* 2:12.
- Santoso.S. (2001). *Buku Latihan SPSS Statistik Non Parametrik*. Jakarta: Elek Media Komputindo.
- Soehadi Koentjoro. (1992). *Analisis Sperma*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Snyder, H.E. and W. Kwon, T. (1987). *Soyhean Utiluzatin. an AVI Book*. Newyork: Van
- Nostrad Rein Hold Company.
- Setchell KDR, Aldercreutz H. (1998). *Mammalian Lignans and Phytoestrogen Recent Studies On Their Formation, Metabolism and Biological Role In Health And Disease*. In: *Role of The Gut Flora in Toxicity and Cancer* (Rowland IR.ed). Pp 315-345.Ac Press. London.UK.

- Schmidl MK, Labuza TP. (2000). *Essentials of Functional Foods*. Gaithersburg Maryland: Aspen Publisher.
- Siswono. (2003). *Infertilitas pada Pria. Dalam Afriani 2010 Gambaran Kecemasan Pasangan Infertil yang berkunjung ke RS Adenan Adenin*. Medan: Fakultas Keperawatan USU.
- Trilsky. (2008). *Infertilitas Pria*. <http://trilsky.wordpress.com/2008/01/09/infertilitas-pria-2/> dikutip tanggal 09.05.2011.
- Tjitrosomo and Sugiri. (1996). *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Winarsi. (2005). *Isoflavon, Berbagai Sumber, Sifat dan Manfaatnya pada Penyakit Degeneratif*. Yogyakarta: UGM University Press.
- Watanabe S, Gang Zhoo V, Melby MK, Ishiwata N, Kimira M. (2006). *Systematic Review Of Intervention Using Isoflavon Supplement And Proposal For Further Studies*. In: Sugono m, editor. *Soy In Health And Disease Prevention Boca Raton*. Florida : CRC Press Taylor & Francis Group LLC.
- WHO. (1994). *Penuntun Laboratorium Who untuk Pemeriksaan Semen Manusia dan Interaksi Sperma-Getah Serviks*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Xu et.al. (1995). *Bioavaibility of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women*. *J Nutr*, 130:798-801.
- Yatim. Wildan. (1994). *Reproduksi dan Embriologi*. Bandung: Tarsito.