

## LARUTAN PENGECER ALTERNATIF NaCl 0,9 % DALAM PENGECATAN GIEMSA PADA PEMERIKSAAN MORFOLOGI SPERMATOZOA

**Maruni Wiwin Diarti, Erlin Yustin Tatontos, Aden Turmuji**

**Abstrak:** Kualitas hasil pewarnaan morfologi spermatozoa menggunakan cat Giemsa sangat dipengaruhi oleh jenis bahan pengencer cat Giemsa. Syarat pengencer yang dapat digunakan adalah memiliki sifat buffer. Larutan NaCl 0,9% selain memiliki sifat buffer juga memiliki harga yang lebih murah. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan mengetahui NaCl 0,9% sebagai larutan pengencer alternatif dalam pengecatan Giemsa pada pemeriksaan morfologi spermatozoa. Penelitian ini dilakukan dengan membandingkan kualitas pewarnaan morfologi spermatozoa menggunakan cat Giemsa yang diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% dan larutan Buffer Fosfat. Hasil penelitian pengecatan Giemsa dengan larutan NaCl 0,9% didapat penyerapan cat morfologi spermatozoa baik adalah 71,625% dan penyerapan cat morfologi spermatozoa tidak baik adalah 28,375 %. Hasil penelitian yang menggunakan larutan Buffer Fosfat didapat penyerapan cat morfologi spermatozoa baik adalah 81,563 % dan penyerapan cat morfologi spermatozoa tidak baik adalah 18,438 %. NaCl 0,9 % dapat digunakan sebagai larutan pengencer alternatif dalam pengecatan Giemsa pada pemeriksaan morfologi spermatozoa.

**Kata Kunci:** Cat Giemsa, Larutan NaCl 0,9%, Morfologi Spermatozoa.

## THE ALTERNATIVE DILUTE SOLUTION OF NaCl 0.9% AT THE GIEMSA STAINING ON THE INVESTIGATION THE MORPHOLOGY OF SPERMATOZOA

**Abstract :** The quality of staining, the morphology of spermatozoon applies The Giemsa dye, is strongly influenced by the type of Giemsa thinner. The terms of diluent that can be used is having a buffer property. The solution of NaCl 0.9 %, besides having buffer properties also has a cheaper price. The research is a descriptive study that aims to determine NaCl 0.9% as the alternative of diluting solution at Giemsa staining on morphological examination of spermatozoon. This study was conducted to compare the quality of spermatozoon morphology staining by using Giemsa which was diluted with 0.9% NaCl solution and the solution of Phosphate Buffer. The result of the study indicated The Giemsa staining with NaCl 0.9% solution, is obtained the outstanding spermatozoon morphology staining absorption was 71.625% and the poor spermatozoon morphology staining absorption was 28.375%. The results of study which was applied the Phosphate Buffer solution, was obtained the outstanding spermatozoon morphology staining absorption was 81.563% and the poor spermatozoon morphology staining absorption was 18.438%. The NaCL 0.9% can be used as an alternative dilute solution at Giemsa staining on morphological examination of spermatozoon.

**Keywords:** Giemsa dye , 0.9 % NaCl solution , Sperm Morphology.

## LATAR BELAKANG

Angka infertilitas pasangan suami-istri di seluruh dunia menurut Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization, WHO*) dan laporan lainnya, diperkirakan 8-12 % pasangan yang mengalami masalah infertilitas selama masa reproduktif mereka. Sedangkan data infertilitas di Indonesia yang mengalami kesulitan untuk mendapatkan anak sekitar 10%. Faktor yang menyebabkan infertilitas berasal dari suami, istri atau keduanya. Menurut penelitian yang dilakukan WHO 1989, faktor penyebab yang berasal dari suami sebesar 40% (Kuswondo, 2002). Faktor-faktor penyebab kasus infertil pada pria antara lain genetik, umur, infeksi, autoantibodi, defisiensi testosteron, hipogonadisme, kanker, faktor lingkungan, efek samping dari pengobatan, *retrograde ejaculation*, *vasectomy*, *varicocele*, dan kualitas spermatozoa (Aryoseto, 2009). Kasus infertilitas dapat diketahui dengan cara pemeriksaan sperma atau analisis semen. Analisis semen atau disebut pemeriksaan sperma merupakan salah satu pemeriksaan yang penting untuk penilaian kesuburan pria. Pemeriksaan analisis semen ini penting tidak hanya untuk para ahli andrologi yang menangani masalah pria tetapi juga penting untuk para ahli ginekologi yang menangani para wanita. Analisis semen manusia berguna bagi pasangan yang ingin melakukan program Keluarga Berencana dan pada pria yang telah dilakukan vasektomi untuk mengetahui apakah semen mereka masih fertil ataukah sudah tidak mengandung spermatozoa lagi (Soeradi, 2003). Kualitas spermatozoa salah satunya ditentukan oleh morfologi dari spermatozoa. Pemeriksaan morfologi

spermatozoa ditujukan dengan melihat bentuk-bentuk spermatozoa. Dengan pemeriksaan ini diketahui beberapa bentuk spermatozoa normal dan abnormal. Untuk pemeriksaan morfologi sperma yang biasa digunakan di laboratorium adalah dengan pulasan giemsa. Giemsa cukup akurat dan sederhana untuk pemeriksaan morfologi (Arsyad, 2011).

Cat Giemsa harus diencerkan terlebih dahulu sebelum dipakai mewarnai spermatozoa. Syarat pengencer giemsa yang ideal yaitu: isotonik, memiliki kemampuan menyangga dengan baik dan mempunyai pH 6,8 – 7,0 agar tidak berpengaruh pada pewarnaan morfologi spermatozoa. Terlalu asam atau berlebih basa maka bisa menimbulkan kualitas penyerapan cat oleh spermatozoa tidak baik, untuk itu diperlukan larutan buffer supaya asam dan basa seimbang. Fungsi dari larutan buffer adalah menjadi zat yang mempertahankan keadaan pH saat sejumlah kecil basa atau asam dimasukkan ke dalam larutan (Sherwood, 2001). Pewarnaan Giemsa dalam analisis morfologi spermatozoa umumnya menggunakan larutan buffer fosfat yang dibuat dengan derajat keasaman 6,8 - 7,2. Pengenceran dengan aquades kurang dianjurkan karena dapat menyebabkan sel spermatozoa mengembang dan pecah karena sifat aquades yang hipertonis. Hal ini disebabkan karena cairan aquades masuk ke dalam sel melalui membran semipermeabel. Oleh karena itu cairan yang masuk ke dalam sel harus bersifat isotonis agar sel tersebut tidak pecah atau mengerut (Sherwood, 2001). Buffer fosfat sebagai larutan buffer karena memiliki sifat isotonis dan mampu menahan perubahan pH ketika ion-ion hidrogen atau hidroksida ditambahkan atau ketika larutan itu

diencerkan disebut larutan penyangga atau larutan dapar (Day & Underwood, 2002). Walaupun buffer fosfat mudah didapatkan, namun harganya cukup mahal, maka perlu larutan alternatif yang bisa digunakan sebagai larutan pengencer dalam pengecatan Giemsa yang lebih murah dan mudah didapatkan seperti NaCl dengan konsentrasi 0,9 %. Larutan NaCl 0,9% memiliki sifat isotonis pada cairan sel dan mampu mempertahankan perubahan pH sperma pada suhu kamar (Rahardianto, 2012); (Ansel & Prince, 2004). Larutan NaCl 0,9% memiliki sifat yang mirip dengan buffer dan berdasarkan hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan oleh peneliti, larutan NaCl 0,9% tidak mempengaruhi kondisi fisik spermatozoa seperti kegunaan buffer fosfat sebagai larutan pengencer cat Giemsa. Namun perlu diuji apakah larutan NaCl 0,9% memiliki kualitas yang sama dengan larutan buffer fosfat sebagai pengencer cat Giemsa dalam analisis morfologi spermatozoa, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai uji NaCl 0,9% sebagai larutan pengencer alternatif dalam pengecatan Giemsa pada pemeriksaan morfologi spermatozoa.

## METODE

Penelitian ini bersifat observasional deskriptif, yaitu penelitian yang dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui gambaran atau deskripsi tentang suatu keadaan secara obyektif. (Notoatmodjo, 2002). Penelitian ini akan mengkaji kemampuan NaCl 0,9% sebagai larutan pengencer cat Giemsa pada pemeriksaan morfologi spermatozoa

dengan menggunakan Buffer fosfat pH 6,8 sebagai pembanding.

**Bahan Penelitian :** Cairan sperma dan Larutan NaCl 0,9 %

**Besar Unit Penelitian :** Adapun cara menentukan besarnya unit penelitian berdasarkan rumus Federer pada buku Kemas Hanafiah (2010) yaitu  $(t - 1) (r - 1) \geq 15$ .

## Variabel Penelitian :

Variabel Bebas : Larutan NaCl 0,9%

Variabel terikat : Hasil pewarnaan pada pemeriksaan morfologi spermatozoa.

## Definisi Operasional

1. Larutan NaCl 0,9% merupakan larutan isotonis yang diperoleh dari 0,9 gram kristal NaCl yang dilarutkan dalam 100 ml aquades dan dinyatakan dalam % b/v.
2. Larutan pengencer merupakan larutan yang digunakan untuk mengencerkan cat giemsa dalam pemeriksaan morfologi spermatozoa.
3. Giemsa adalah pewarna yang digunakan dalam pengecatan sel yang akan diencerkan dengan larutan buffer posfat dan NaCl 0,9%.
4. Pemeriksaan morfologi spermatozoa merupakan bagian dari pemeriksaan sperma yang meliputi pengamatan gambaran bagian sel spermatozoa (kepala, leher dan ekor).

## Data yang Dikumpulkan

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah hasil pewarnaan Giemsa dan hasil pemeriksaan morfologi spermatozoa menggunakan buffer fosfat pH 6,8 ( sebagai pembanding) dan NaCl 0,9 %

sebagai larutan pengencer Giemsa yang diamati secara mikroskopis.

**Instrumentasi penelitian :** Glass bekkor, *Objek glass*, *Cover glass*, Bak pewarnaan, Pipet pastur, Pipet ukur, Botol cat, Mikroskop . Reagen : Cat Giemsa induk dengan konsentrasi 10 %, Buffer fosfat pH 6,8 dan Prosedur kerja :

Pembuatan Buffer fosfat pH 6,8

- 1) Dibuat larutan stok A: Ditimbang  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 27,8 gram, dilarutkan dalam 1 liter aquades.
- 2) Dibuat larutan stok B: Ditimbang  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 71,1 gram, dilarutkan dalam 1 liter aquades.
- 3) Dipipet 51,0 ml larutan dari stok A masukkan ke glass bekkor.
- 4) Ditambahkan 49,0 ml larutan dari stok B
- 5) Dihomogenkan, dimasukkan ke botol lalu di beri label.

Pembuatan larutan NaCl 0,9 %

- 1) Ditimbang kristal NaCl sebanyak 0,9 gram.
- 2) dilarutkan dalam aquades 100 ml sehingga didapat konsentrasi 0,9%.

Pembuatan larutan stok Giemsa dengan pengencer Buffer fosfat pH 6,8 sebanyak 5 ml (diencerkan 5 kali ).

- 1) Dipipet giemsa pokok sebanyak 10 ml.
- 2) Ditambahkan 40 ml Buffer fosfat.
- 3) Dimasukkan ke dalam botol, kemudian diberi label.

Pembuatan stok giemsa dengan pengencer larutan NaCl 0,9% sebanyak 50 ml (diencerkan 5 kali).

- 1) Dipipet Giemsa pokok sebanyak 10 ml.

- 2) Ditambahkan larutan NaCl 0,9 % sebanyak 40 ml.

- 3) Dimasukkan ke dalam botol, kemudian diberi label.

Pembuatan hapusan sperma

- 1) Diteteskan sperma ke *objek glass* sebanyak 1 tetes ( $40 \mu$ ).
- 2) Dibuat hapusan dengan mendorong menggunakan *cover glass* dengan kemiringan *cover* 25 – 30<sup>0</sup>, kemudian dikeringkan.

Pewarnaan hapusan dengan cat Giemsa stok dengan pengencer Buffer fosfat

- 1) Diletakkan hapusan diatas rak pewarnaan.
- 2) Difiksasi dengan methanol selama 5 menit.
- 3) Diwarnai dengan pewarnaan Giemsa, biarkan selama 15-20 menit.
- 4) Dibilas dengan air suling.

- 5) Diletakkan hapusan dalam sikap vertikal dan biarkan mengering oleh udara.

Pewarnaan hapusan dengan cat Giemsa stok dengan pengencer NaCl 0,9 %

- 1) Diletakkan hapusan diatas rak pewarnaan.
- 2) Difiksasi dengan methanol selama 5 menit.
- 3) Diwarnai dengan pewarnaan Giemsa stok, biarkan selama 15 - 20 menit.
- 4) Dibilas dengan air suling.
- 5) Diletakkan sediaan dalam sikap vertikal dan biarkan mengering oleh udara.

Pembacaan morfologi spermatozoa

- 1) Diletakkan hapusan diatas meja objektif mikroskop.
- 2) Ditetesi dengan *oil imersi*.
- 3) Diamati morfologi spermatozoa berdasarkan dari kualitas penyerapan cat warna giemsa pada

kepala, leher dan ekor spermatozoa dengan kriteria sebagai berikut:

Penyerapan Cat Baik : Bila hasil pewarnaan bersih, bisa membedakan dengan jelas bagian spermatozoa (kepala, leher dan ekor), spermatozoa terlihat jelas dan tidak rusak, kepala berwarna ungu dan leher dan ekor abu-abu sampai ungu.

Penyerapan Cat Tidak Baik : Bila hasil pewarnaan kotor, bagian spermatozoa tidak terlihat dengan jelas dan spermatozoa rusak.

**Analisis Data :** Data yang diperoleh mengenai hasil pewarnaan dan pemeriksaan morfologi spermatozoa menggunakan pulasan Giemsa dengan pengencer NaCl 0,9 %, dan buffer posfat pH 6,8 (sebagai pembanding) disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis dengan cara deskriptif.

**HASIL PENELITIAN**

Hasil pengecatan Giemsa yang diencerkan dengan NaCl 0,9% pada pemeriksaan morfologi spermatozoa meliputi penyerapan cat oleh kepala, leher dan ekor dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1 Hasil pengecatan Giemsa yang diencerkan NaCl 0,9 % pada pemeriksaan morfologi spermatozoa**

No	Kualitas penyerapan cat Giemsa	Morfologi spermatozoa	
		Rerata (sel)	Persentase
1	Penyerapan Cat Baik	71,63	71,63%
2	Penyerapan Cat Tidak Baik	28,38	28,38%
<b>Jumlah</b>		100	100%

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan morfologi spermatozoa menggunakan cat Giemsa yang diencerkan dengan larutan NaCl 0.9% dan dihitung dalam 100 sel/replikasi didapatkan jumlah morfologi spermatozoa dengan kategori penyerapan

cat baik sebanyak 71,63%. Sedangkan jumlah morfologi spermatozoa dengan kategori penyerapan cat tidak baik sebanyak 28,38%.

Hasil pengecatan Giemsa yang diencerkan dengan Buffer Fosfat pada pemeriksaan morfologi spermatozoa meliputi penyerapan cat oleh kepala, leher dan ekor dapat dilihat pada tabel 4.2.

**Tabel 4.2 Hasil pengecatan Giemsa yang diencerkan dengan larutan Buffer Fosfat pada pemeriksaan morfologi spermatozoa**

No	Kualitas penyerapan cat Giemsa	Morfologi spermatozoa	
		Rerata (sel)	Persentase
1	Penyerapan Cat Baik	81,56	81,56%
2	Penyerapan Cat Tidak Baik	18,44	18,44%
<b>Jumlah</b>		100	100%

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan morfologi spermatozoa menggunakan cat Giemsa yang diencerkan dengan larutan Buffer Fosfat dan dihitung dalam 100 sel/replikasi didapatkan jumlah morfologi spermatozoa dengan kategori penyerapan cat baik sebanyak 81,56%. Sedangkan jumlah morfologi spermatozoa dengan kategori penyerapan cat tidak baik sebanyak 81,56%.

**PEMBAHASAN**

Pemeriksaan morfologi spermatozoa merupakan salah satu parameter penilaian kualitas sperma pria. Pemeriksaan morfologi spermatozoa ditujukan dengan melihat bentuk-bentuk spermatozoa. Dengan pemeriksaan ini diketahui beberapa bentuk spermatozoa normal dan abnormal. Untuk pemeriksaan morfologi sperma yang biasa digunakan di laboratorium adalah dengan pulasan giemsa. Giemsa cukup akurat dan sederhana untuk pemeriksaan morfologi ( Arsyad, 2011).

Agar pH cat Giemsa tetap stabil dan pemakaian cat menjadi lebih irit pada saat pewarnaan, cat Giemsa diencerkan terlebih dahulu sebelum mewarnai spermatozoa. Larutan pengencer yang digunakan harus memiliki sifat buffer yaitu larutan yang bersifat isotonis dan mampu mempertahankan keseimbangan asam dan basa dan memiliki pH 6,8 – 7,2 agar tidak berpengaruh pada pewarnaan morfologi spermatozoa. Terlalu asam atau berlebih basa maka bisa menimbulkan kualitas penyerapan cat oleh spermatozoa tidak baik (Sherwood, 2001).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan larutan NaCl 0,9 % dan Buffer Fosfat sebagai bahan pengencer cat Giemsa yang digunakan dalam mewarnai spermatozoa menunjukkan perbedaan kualitas penyerapan warna oleh spermatozoa. Pada penggunaan larutan Buffer Fosfat masih adanya leher dan ekor yang tidak terlihat. Hal ini dapat terjadi karena kondisi abnormalitas spermatozoa.

Hasil morfologi spermatozoa dengan penggunaan NaCl 0,9 % sebagai larutan pengencer cat Giemsa menunjukkan masih ada kepala, leher dan ekor spermatozoa yang tidak berwarna ungu tetapi berwarna biru muda, hal ini dapat disebabkan karena pH larutan NaCl 0,9 % lebih dari 7 sehingga inti sel spermatozoa lebih menyerap zat warna basa (*Azur bluish*), yang akan menyebabkan warna sel spermatozoa menjadi biru muda. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Widya Bhakti Suryanata tahun 2013 yang menyatakan bahwa pH pengencer cat Giemsa sangat berpengaruh terhadap kualitas pewarnaan suatu sediaan apus.

Meskipun masih ada beberapa morfologi spermatozoa yang penyerapan catnya tidak baik atau tidak memenuhi kriteria pewarnaan pada pemakaian NaCl 0,9 % sebagai pengencer cat Giemsa, namun sebagian besar morfologi spermatozoa memenuhi kriteria baik yaitu spermatozoa utuh dan jelas, warna yang kontras dan yang paling penting morfologi spermatozoa dapat diamati.

Dasar dari pemeriksaan Romanowsky adalah penggunaan dua zat warna yang berbeda yaitu Azur B (*Bluish*) bersifat basa dan Eosin Y (*Yellowish*) bersifat asam. Azur B akan mewarnai komponen sel yang bersifat asam seperti kromatin, dan beberapa struktur sitoplasma (DNA dan RNA) menjadi warna biru sampai ungu. Sedangkan Eosin Y akan mewarnai komponen sel yang bersifat basa seperti mitokondria dan granula menjadi warna merah oranye. Ikatan Eosin Y pada Azur B yang beragregasi dapat menimbulkan warna ungu, dan keadaan ini dikenal sebagai efek Romanowsky giemsa. Efek ini terjadi sangat nyata pada DNA tetapi tidak pada RNA sehingga menimbulkan kontras antara inti sel yang berwarna ungu kemerahan dengan sitoplasma yang berwarna ungu (Yuliana, 2013).

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas hasil pewarnaan antara lain kualitas Giemsa induk, kualitas pengencer cat Giemsa, kebersihan slide, lama fiksasi dengan methanol dan ketebalan sediaan. Kualitas cat Giemsa yang digunakan harus dicek mutunya dan dilihat tanggal kadaluwarsa cat tersebut. Giemsa yang mutunya jelek atau sudah rusak tidak akan mengeluarkan warna ungu atau merah (Suryanta, dkk, 2012).

Penelitian ini membuktikan bahwa larutan NaCl 0,9 % dapat dijadikan sebagai larutan pengencer alternatif cat Giemsa. Penelitian ini didukung oleh hasil penelitian Adianto tahun 2013 yang menyatakan bahwa larutan pengencer cat Giemsa yang memiliki sifat buffer akan menunjukkan hasil pewarnaan yang lebih baik dibandingkan dengan aquades.

### KESIMPULAN

Larutan NaCl 0,9% memiliki kemampuan sebagai pengencer alternatif dalam pengecatan Giemsa pada pemeriksaan morfologi spermatozoa. Larutan NaCl 0,9% memiliki sifat isotonis yang dilihat dari bentuk fisik spermatozoa yang tidak berubah. Larutan NaCl 0,9% sebagai larutan pengencer cat Giemsa dalam pemeriksaan morfologi spermatozoa memiliki kualitas yang lebih rendah dari larutan Buffer Fosfat dengan selisih morfologi spermatozoa kategori penyerapan cat baik adalah 9,938%.

### Saran

Bagi petugas laboratorium sebaiknya menggunakan larutan NaCl 0,9% sebagai larutan pengencer cat Giemsa, karena memiliki harga yang lebih murah.

### DAFTAR PUSTAKA

Adianto, W. (2013). Perbedaan Morfologi Sel Darah Pada Pengecatan Giemsa Yang Diencerkan Menggunakan Aquades Dan Buffer pH 6,8. *Karya Tulis Ilmiah*. Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang

Alimul Hidayat, A. A., & Uliyah, M. (2008). *Keterampilan Dasar Praktik Klinik Kebidanan* (2nd ed., p. 45). Jakarta: Penerbit Salemba Medika.

Analisis Kesehatan Maram. 2013. *Diktat Praktikum Cytohistoteknologi*. Analisis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Mataram.

Ansel, H. C., & Prince, S. J. (2004). *Kalkulasi Farmasetik*. Jakarta: EGC.

Arios, R., Tomuka, D., & Kristanto, E. (2014). Efektifitas Deteksi Spermatozoa Menggunakan Pewarna Malachite Green. *Jurnal E-CliniC(eCl), Manado*.

Aryoseto, L. (2009). Hubungan Antara Jumlah Leukosit Dengan Morfologi Spermatozoa Pada Pasien Infertilitas Di Rumah Sakit Dokter Kariadi. *Tesis*. Universitas Diponegoro. Semarang

Bhakti Suryanata, W. (2013). Pengaruh pH Buffer Pada Pengencer Giemsa Terhadap Gambaran Mikroskopis Sediaan Apus Malaria. *Karya Tulis Ilmiah*. Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang.

Day, R. ., & Underwood, A. . (2002). *Analisis Kimia Kuantitatif* (Edisi Keen, p. 148). Jakarta: Penerbit Erlangga.

Depkes, RI. (2005). *Good Laboratory Practice*. Depkes, RI.

E. Johnson, K. (2011). *Quick Review Histologi & Biologi Sel*. Jakarta: Binampa Aksara.

Eka Pramana W, R., Suryani, M., & Supriyono, M. (2015). Efektivitas Pengobatan Madu Alami Terhadap Penyembuhan Luka Infeksi Kaki Diabetik (IKD), 5–10.

Ferdinan P, F., & Ariebowo, M. (2007). *Praktis Belajar Biologi* (1st ed., p. 184). Jakarta: Visindo Media Persada.

Gandosoebrata, R. (2010). *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: Dian Rakyat.

Joseph, & Hadjiza, B. W. (2013). *Basic Physical Pharmacy*. (W. Brotmiller, Ed.). Burlington.

Arsyad. (2011). Morfologi Sperma. *Perkumpulan Andrologi Indonesia*, 1486.

Lefever Kee, J. (2008). *Pedoman Pemeriksaan Laboratorium & Diagnostik*. (R. P. Kapoh, Ed.) (6th ed., p. 415). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

- M. Horne, M., & L. Swearingen, P. (2001). *Keseimbangan Cairan, Elektrolit dan Asam Basa* (2nd ed., p. 11). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Novel, S. S. (2010). *Kamus Biologi SMA* (p. 94). Jakarta: Gagas Media.
- Permata Sari, O. (2007). Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Dosis Bertingkat Terhadap Jumlah Spermatozoa Mencit Jantan Strain. *Karya Tulis Ilmiah*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Rahardhianto, A., Abdulgani, N., & Trisyani, N. (2012). Pengaruh Konsentrasi Larutan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Viabilitas dan Motilitas Masa Penyimpanan. *Jurnal Sains Dan Seni*. ISSN: 2301-928X
- Sherwood, Lauralle (2001). *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Jakarta : EGC.
- Subartha, I. M. (2000). *Analisis Sperma Rutin*. Denpasar: Penerbit Upada Sastra.
- Sunanda, P., Panda, B., & Dash, C. (2014). Prevalensi Spermatozoa Abnormal Pada Laki - laki Subur Pengunyah Tembakau. *Jurnal of Human Reproductive Sciences*. India
- Suryanta, Soebiono, & Kurniati, E. (2012). Pengaruh Variasi Konsentrasi Giemsa Terhadap Hasil Pewarnaan Sediaan Darah Tipis Pada Pemeriksaan *Plasmodium sp.* *Karya Tulis Ilmiah*. Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- WHO, Edition, F. (2010). *Laboratory Manual For The Examination And Processing Of Human Semen* (pp. 13 - 18). Brazil:WHO
- Yuliana, R. (2013). Kualitas Pewarnaan Pada Sediaan Apusan Darah Tebal Malaria Dengan Teknik Penggenangan Dan Perendaman. *Karya Tulis Ilmiah*. Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang.