

Perbandingan Angka Keberhasilan Kebuntingan (*Pregnancy Rate*) Mencit Balb/C Yang Dikawinkan Semalam Dengan Dan Tanpa Sinkronisasi Estrus

Annisa Tiara Putri*, Teguh Wahyu Sardjono**, Etty Kurnia***

ABSTRAK

Beberapa penelitian khususnya yang berkaitan dengan kehamilan dan perkembangan janin, tentu memerlukan hewan coba yang spesifik, yaitu mencit yang dalam kondisi bunting. Sementara itu, terdapat kesulitan dalam mendapatkan mencit bunting homogen dengan jumlah yang cukup. Salah satu cara untuk mendapatkan sampel mencit bunting yang sama adalah dengan mengawinkan mencit pada kondisi yang sama yaitu kondisi estrus. Sinkronisasi estrus alami dapat dilakukan dengan memanfaatkan teori *Lee-Boot effect* dan *Whitten effect*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan *pregnancy rate* mencit yang dikawinkan semalam dengan dan tanpa sinkronisasi estrus. Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok yaitu kelompok sinkronisasi estrus monogami, sinkronisasi estrus poligami, tanpa sinkronisasi estrus monogami dan tanpa sinkronisasi estrus poligami. Kelompok dengan sinkronisasi dilakukan *Lee-boot effect* selama 14 hari dan *Whitten effect* 72 jam. Setelah itu, semua kelompok dikawinkan secara serentak selama satu malam. Dari hasil penelitian, *pregnancy rate* mencit BALB/c yang dikawinkan semalam secara monogami lebih tinggi dengan sinkronisasi estrus yaitu sebesar 25% dibandingkan tanpa sinkronisasi estrus yaitu sebesar 17,65%. Sedangkan pada kelompok poligami tidak didapatkan perbedaan *pregnancy rate* yaitu 15%. Berdasarkan analisis statistika menggunakan *Chi square*, dengan nilai signifikansi $p > 0.05$, dapat disimpulkan bahwa ada tidak ada pengaruh yang signifikan antara sinkronisasi dengan kebuntingan.

Kata kunci: sinkronisasi estrus, *Mus musculus*, *Lee-boot effect*, *Whitten effect*, *pheromone*, *pregnancy rate*.



Pregnancy Rate Comparison of BALB/c Mice Mating One Night with and without Estrous Synchronization

Annisa Tiara Putri*, Teguh Wahyu Sardjono**, Etty Kurnia***

ABSTRACT

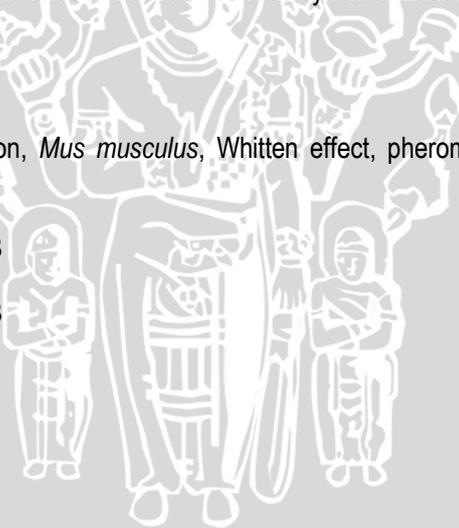
Some researches, especially about pregnancy and fetal development needs specific animal which is a pregnant mice. There is a difficulty in finding some pregnant mice that is homogen. One of the methods that can be used for having same pregnant mice is mating them in the same condition when they are in the estrous phase. Estrous synchronization can be done by using *Lee-boot and Whitten effects*. The goal of this research is to find the pregnancy rates differences between the group with and without estrous synchronization. There are 4 groups in this experiment: monogami with and without synchronization, poligami with and without synchronization. Lee-boot effects is done for 14 days and 72 hours for whitten effects. After that, each mice of all groups is mating for a night. The results shows that pregnancy rate in the monogami groups with synchronization (25%) was higher than without estrous synchronization (17,65%). While in poligami groups, there was no pregnancy rate differences between with and without estrous synchronization (15%). Based on the analytical statistics using Chi Square test, $p\text{ value} > 0.05$, so the conclusion is the relation between estrous synchronization and pregnancy is not significant.

Keywords: estrous synchronization, *Mus musculus*, Whitten effect, pheromone, Lee-boot effect, pregnancy rate

*Program Studi Kedokteran FKUB

**Laboratorium Parasitologi FKUB

***Laboratorium Forensik FKUB



PENDAHULUAN

Dalam penelitian-penelitian yang berkaitan dengan kehidupan khususnya di bidang biologi dan biomedik, seringkali diperlukan hewan coba sebelum penelitian tersebut diterapkan kepada manusia. Dari berbagai jenis hewan coba, mencit merupakan hewan yang paling sering digunakan karena memiliki beberapa keuntungan, yaitu interval generasi singkat, laju reproduksi tinggi, biaya yang murah, lingkungan hidupnya dapat dikontrol dan distandardisasi serta pengetahuan yang luas tentang genetika mencit.¹ Penelitian khususnya yang berkaitan dengan kehamilan dan perkembangan janin, tentu memerlukan hewan coba yang spesifik, yaitu mencit yang dalam kondisi bunting. Sementara itu, terdapat kesulitan dalam mendapatkan mencit bunting homogen dengan jumlah yang cukup. Kesulitan itu menjadi bertambah ketika dibutuhkan sejumlah mencit bunting dengan usia gestasi yang sama.

Salah satu cara untuk mendapatkan sampel mencit bunting yang sama adalah dengan mengawinkan mencit pada kondisi yang sama yaitu kondisi estrus. Beberapa metode sinkronisasi estrus telah dikembangkan, antara lain dengan penggunaan sediaan progesteron, prostaglandin $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), serta kombinasinya dengan *gonadotropin releasing hormone* ($GnRH$).² Akan tetapi, penggunaan prostaglandin telah dinyatakan mengganggu keberhasilan untuk mendapatkan embrio bahkan meningkatkan kejadian regresi korpus luteum secara prematur.³

Sementara itu, sinkronisasi alami dapat dilakukan dengan memanfaatkan teori *Lee-Boot effect* dan *Whitten effect*. Kedua teori ini digunakan pada laboratorium untuk

membantu menginduksi sinkronisasi waktu kehamilan.⁴ Efek ini berkaitan erat dengan teori mengenai *pheromone*, yaitu sebuah senyawa yang menyebabkan induksi estrus dan dapat digunakan untuk menghasilkan perubahan estrus yang sinkroni.⁵

Keberhasilan perkawinan yang terjadi pada mencit dapat dideteksi dengan adanya *vaginal plugs*. Bagaimanapun juga, *vaginal plugs* tidak menjamin kehamilan tapi mengkonfirmasi terjadinya perkawinan.⁶ Untuk itu, mengetahui *pregnancy rate* pada perkawinan mencit diperlukan sebagai acuan agar dapat memperoleh jumlah sampel mencit bunting yang diinginkan. *Pregnancy rate* dapat berbeda-beda dan dapat dipengaruhi oleh suhu, makanan, pencahayaan dan waktu. Selain itu *mating system* juga berpengaruh dimana mencit betina bunting dengan metode poligami cenderung memiliki kemungkinan akan memiliki *pregnancy rate* dan jumlah kelahiran yang rendah.⁷ Dalam sebuah penelitian, diketahui *pregnancy rate* mencit yang dikawinkan 1:1 adalah 11% dan dengan sinkronisasi estrus menjadi 51%.⁸

Atas dasar hal-hal yang disebutkan di atas, maka dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan angka keberhasilan kebuntingan antara mencit yang dikawinkan dengan sinkronisasi estrus dan tanpa sinkronisasi estrus. Data yang diperoleh diharapkan dapat menjadi dasar penghitungan jumlah sampel yang diperlukan untuk penelitian-penelitian yang memerlukan mencit bunting sebagai hewan coba.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true experimental* yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan *pregnancy rate* mencit yang dikawinkan dengan dan tanpa

sinkronisasi estrus alami yang dikawinkan monogami dan poligami.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah 60 ekor mencit betina nullipara strain BALB/c dengan umur 10-12 minggu dan berat badan 25-35 gram. Mencit jantan digunakan untuk mengawinkan mencit betina. Mencit didapat dari LPPT UGM. Sinkronisasi estrus alami dilakukan dengan cara mengumpulkan mencit betina agar anestrus (*Lee-boot effect*) lalu dipaparkan dengan urine mencit jantan sebagai *pheromone* untuk menginduksi fase estrus (*Whitten effect*).

Sebelum penelitian dimulai, kandang dan semua peralatan dibersihkan dan mencit betina diaklimatisasi selama 1 minggu, ditempatkan dalam kandang dengan diberi makan dan air secara *ad libitum*, dipelihara pada suhu ruang 27°C dan siklus pencahayaan 12 jam.

Mencit betina secara acak dibagi ke dalam 4 kelompok. Pada kelompok 1 dan 2, mencit betina dikumpulkan dalam satu kandang berisi 5 ekor mencit selama 14 hari. Kandang ditempatkan pada lokasi yang berbeda dan berjauhan dengan kandang mencit jantan. Setelah 14 hari, mencit betina pada kelompok 1 dan 2 dipaparkan dengan bau urin mencit jantan selama 72 jam, dilakukan dengan menempatkan kandang betina dan jantan berdekatan namun tetap dalam kandang terpisah. Kemudian pada kelompok 1, 5 ekor mencit dimasukkan ke dalam satu buah kandang (dikawinkan) bersama dengan 1 mencit jantan selama 1 malam. Pada kelompok 2, masing-masing mencit dimasukkan ke dalam satu buah kandang (dikawinkan) bersama dengan 1 mencit jantan selama 1 malam. Pada kelompok 3, tiap 5 ekor mencit dimasukkan ke dalam satu buah kandang (dikawinkan) bersama dengan 1 mencit jantan selama 1 malam.

Pada kelompok 4, masing-masing mencit betina dimasukkan ke dalam satu buah kandang (dikawinkan) bersama dengan 1 mencit jantan selama 1 malam. Setelah 1 malam, mencit betina pada kelompok 1, 2, 3 dan 4 dimasukkan ke dalam kandang lain, terpisah dari mencit jantan dan diamati kebuntingannya selama 21 hari.

Pengolahan dan analisis data yang dibuat berdasarkan perhitungan *pregnancy rate* yang dihitung dari jumlah mencit yang didapatkan bunting dibagi dengan jumlah mencit yang dikawinkan selama 1 malam. Untuk mengetahui pengaruh antara sinkronisasi dengan kebuntingan dilakukan analisis data menggunakan tes *Chi square*.

HASIL PENELITIAN

Pada hari ke 19-21 setelah dikawinkan, dilakukan pengamatan terhadap masing-masing kelompok. Mencit yang berhasil bunting dan melahirkan dicatat jumlahnya. Kemudian dihitung *pregnancy rate* pada masing-masing kelompok

Tabel 1. *Pregnancy rate* mencit

Kelompok	Bunting				Total	
	Ya		Tidak			
	N	%	N	%	N	%
Monogami						
Dengan sinkronisasi	4	25%	12	75%	16	100%
Tanpa sinkronisasi	3	17.65%	14	82.35%	17	100%
Poligami						
Dengan sinkronisasi	3	15%	17	85%	20	100%
Tanpa sinkronisasi	3	15%	17	85%	20	100%

Untuk mengetahui hubungan antara sinkronisasi dengan kebuntingan dilakukan uji *Chi square*, baik pada mencit yang dikawinkan monogami dan poligami. Tabulasi silang antara sinkronisasi dan kebuntingan mencit monogami dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Tabulasi silang antara sinkronisasi dengan kebuntingan kelompok monogami

Kelompok	Bunting		Total	
	Ya	Tidak		
Dengan Sinkronisasi	f	4	12	16
	%	25	75	100
Tanpa Sinkronisasi	f	3	14	17
	%	17.65	82.35	100
Total	f	7	26	33
	%	21.21	78.8	100

$\chi^2 = 0.267$ Odds Ratio = 1,55 p=0,606

Pada Tabel 5.2 diatas terlihat bahwa dari 33 mencit terbagi menjadi 4 golongan, untuk yang kelompok dengan sinkronisasi yang mengalami bunting sebanyak 4 mencit atau 25%, sedangkan yang mengalami tidak bunting sebanyak 12 mencit atau 75%. Sementara itu untuk kelompok tanpa sinkronisasi mengalami bunting sebanyak 3 mencit atau 17,65%, sedangkan tidak bunting sebanyak 14 mencit atau 82,35%.

Nilai *Odds Ratio* didapatkan sebesar 1,55 menunjukkan bahwa kelompok dengan sinkronisasi lebih banyak 1,55 kali mengalami kebuntingan dibandingkan dengan tanpa sinkronisasi. Berdasarkan pada hasil Tabel 2 didapatkan bahwa hasil *Chi Square* dengan p value sebesar 0,606, karena nilai $p = 0,606 > 5\%$ ($\alpha = 5\%$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh/hubungan signifikan antara sinkronisasi dengan kebuntingan pada kelompok monogami.

Dilakukan juga uji *Chi square* untuk mengetahui hubungan antara sinkronisasi dengan kebuntingan pada kelompok poligami. Tabulasi silang antara sinkronisasi dan kebuntingan mencit monogami dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Tabulasi silang antara sinkronisasi dengan kebuntingan kelompok poligami

Kelompok	Bunting		Total	
	Ya	Tidak		
Dengan Sinkronisasi	f	3	17	20
	%	15	85	100
Tanpa Sinkronisasi	f	3	17	20
	%	15	85	100
Total	f	6	34	40
	%	15	85	100

$\chi^2 = 0.000$ odds Ratio =1.00 p = 1.000

Pada Tabel 5.3 diatas terlihat bahwa dari 40 mencit terbagi menjadi 4 golongan, untuk yang kelompok dengan sinkronisasi yang mengalami bunting sebanyak 3 mencit atau 15% sedangkan tidak bunting sebanyak 17 mencit atau 85%. Sementara itu untuk yang kelompok tanpa sinkronisasi mengalami bunting sebanyak 3 mencit atau 15% sedangkan tidak bunting sebanyak 17 mencit atau 85%.

Nilai *Odds Ratio* sebesar 1 menunjukkan bahwa resiko kebuntingan antara kelompok dengan sinkronisasi dengan kelompok tanpa sinkronisasi memiliki peluang yang sama besar.. Berdasarkan pada hasil Tabel 5.3 didapatkan bahwa hasil *Chi Square* dengan p value sebesar 1,000, karena nilai $p = 1,000 > 5\%$ ($\alpha = 5\%$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh/hubungan signifikan antara sinkronisasi dengan kebuntingan poligami.

Selanjutnya dilakukan juga analisa untuk mengetahui perbedaan pregnancy rate mencit yang dilakukan sinkronisasi dengan dikawinkan monogami dan poligami. Tabulasi silang antara perkawinan dan kebuntingan dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Tabulasi silang antara perkawinan dengan kebuntingan

Kelompok	Bunting		Total	
	Ya	Tidak		
Monogami	f	4	12	16
	%	25.00	75.00	100.00
Poligami	f	3	17	20
	%	15.00	85.00	100.00
Total	f	7	29	36
	%	19.44	80.56	100

$\chi^2 = 0.567$ Odds Ratio = 1,88 p = 0,451

Pada Tabel 5.4 diatas terlihat bahwa dari 36 mencit terbagi menjadi 4 golongan, untuk yang kelompok monogami yang mengalami bunting sebanyak 4 mencit atau 25%, sedangkan yang tidak bunting sebanyak 12 mencit atau 75%. Sedangkan kelompok poligami mengalami bunting sebanyak 3 mencit atau 15%, sedangkan tidak bunting sebanyak 17 mencit atau 85%.

Nilai *Odds Ratio* sebesar 1,88 menunjukkan bahwa kelompok dengan monogami lebih banyak 1,88 mengalami kebuntingan dibandingkan dengan poligami. Berdasarkan pada hasil Tabel 5.4 didapatkan bahwa hasil *Chi Square* dengan *p value* sebesar 0,451, karena nilai $p = 0,451 > 5\%$ ($\alpha = 5\%$), sehingga dapat disimpulkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara perkawinan dengan kebuntingan.

PEMBAHASAN

Sinkronisasi estrus alami merupakan salah satu cara untuk memenuhi kebutuhan berbagai penelitian akan sampel mencit bunting homogen. Dengan melakukan sinkronisasi estrus, mencit mengalami fase estrus dalam waktu yang bersamaan sehingga dapat kawin dalam waktu bersamaan pula, dengan begitu dapat diperoleh sejumlah mencit bunting dengan umur kebuntingan yang sama. Dalam

penelitian yang membutuhkan sejumlah sampel mencit bunting tersebut, perlu diketahui *pregnancy rate* untuk menentukan seberapa banyak mencit yang harus dikawinkan untuk mendapatkan jumlah sampel mencit bunting sesuai yang diinginkan. Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan perbedaan *pregnancy rate* mencit BALB/c yang dikawinkan semalam dengan dan tanpa sinkronisasi estrus.

Hasil penelitian membuktikan bahwa *pregnancy rate* mencit BALB/c yang dikawinkan secara monogami dengan sinkronisasi estrus (25%) lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa sinkronisasi (17%). Hal ini dikarenakan pada kelompok mencit yang mengalami sinkronisasi estrus banyak yang berada dalam fase estrus pada saat dikawinkan. Saat dilakukan *Lee-boot effect*, secara serentak semua mencit berada dalam kondisi anestrus. Dasar endokrinologi dari efek tersebut adalah *pheromone* dari mencit betina mensupresi pelepasan FSH.⁹ Setelah dipaparkan *pheromone* mencit jantan selama 72 jam, mencit berada dalam fase estrus. *Pheromone* mencit jantan menstimulasi pelepasan *Gonadotropin Hormone* yang diikuti dengan lonjakan LH (*Luteinizing Hormone*) dan ovulasi. *Pheromone* seksual yang terlibat dalam *Lee-boot effects* mungkin memodifikasi steroid dan ditransmisikan via *urine* mencit jantan ke olfaktori mencit betina.⁹ Sedangkan pada kelompok yang tidak dilakukan sinkronisasi estrus, mencit berada dalam fase yang bermacam-macam. Kemungkinan untuk mengalami kebuntingan lebih kecil karena tidak semua berada dalam fase estrus sehingga tidak terjadi ovulasi pada saat dikawinkan. Hasil penelitian ini sejalan dengan Mader dkk⁸ yang mengatakan bahwa *pregnancy rate* mencit yang dikawinkan 1:1 dengan sinkronisasi estrus (51%) lebih tinggi dibandingkan tanpa

sinkronisasi estrus (11%). Akan tetapi, berdasarkan hasil analisis data menggunakan *Chi-square test*, pada kelompok mencit monogami didapatkan hasil $p=0,606$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh/hubungan signifikan antara sinkronisasi dengan kebuntingan. Hasil yang tidak signifikan ini dapat terjadi karena beberapa faktor, antara lain pada penelitian ini mencit betina yang digunakan adalah mencit nullipara, sehingga tidak dapat dipastikan bahwa semua mencit tersebut fertil, sama halnya dengan mencit jantan yang digunakan untuk mengawinkan. Selain itu pada kelompok mencit yang dilakukan sinkronisasi estrus didapatkan beberapa pejantan mati saat dikawinkan, sehingga tidak dapat dipastikan kopulasi terjadi.

Sementara itu, pada mencit yang dikawinkan secara poligami, tidak terdapat perbedaan *pregnancy rate* antara sinkronisasi dan tanpa sinkronisasi yaitu sebesar 15%. Hasil analisis data pada kelompok poligami didapatkan hasil p value sebesar 1,000, karena nilai $p = 1,000 > 5\%$ ($\alpha = 5\%$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh/hubungan signifikan antara sinkronisasi dengan kebuntingan. Hal ini dapat terjadi dikarenakan meskipun mencit berada dalam kondisi estrus akan tetapi pada perkawinan poligami ada kemungkinan mencit memiliki *pregnancy rate* yang rendah karena reduksi dari jumlah sperma yang diejakulasikan pada pasangan selanjutnya.¹²

Dilakukan juga analisis untuk mengetahui perbedaan antara *pregnancy rate* sinkronisasi estrus monogami dan poligami. Hasil yang didapatkan yaitu $p=0,451$, karena nilai $p = 0,451 > 5\%$ ($\alpha = 5\%$), sehingga dapat disimpulkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara monogami dan poligami. Hal ini dapat dikarenakan oleh jumlah sampel yang kecil. Semakin besar

ukuran sampel yang digunakan maka semakin kecil nilai kritis yang dipakai acuan. Selain itu, keunikan dari setiap individu dalam penelitian ini juga dapat mempengaruhi. Kondisi setiap individu yang memungkinkan tidak terjadinya kebuntingan maupun kopulasi dapat mempengaruhi hasil. Pada penelitian ini mencit yang digunakan adalah nullipara sehingga tidak dapat dipastikan fertilitasnya. Alat ukur yang kurang *valid* dan *reliable* juga merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap signifikansi data. Akan tetapi, dalam penelitian ini kemungkinan tersebut dapat disingkirkan karena *pregnancy rate* diketahui dengan mengikuti kebuntingan sampai mencit melahirkan. Jadi bisa dipastikan bahwa data kebuntingan adalah *valid*.

Adapun keterbatasan dari penelitian ini adalah tidak diketahui kondisi reproduksi serta fertilitas dari masing-masing mencit. Kondisi dari mencit jantan yang dipakai untuk mengawinkan juga sangat berpengaruh, perlu dipastikan bahwa mencit yang dipakai dalam perkawinan dalam kondisi prima dan fertil. Selain itu, tidak diketahui keberhasilan sinkronisasi estrus yang dilakukan sebelum mengawinkan mencit. Pemeriksaan apusan vagina penting dilakukan untuk memastikan semua mencit hasil sinkronisasi berada dalam fase estrus. Faktor eksternal lain seperti suhu, suara dan kelembaban yang dapat mempengaruhi tingkat kebuntingan tidak dapat dikontrol juga dapat berubah sewaktu-waktu.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Pregnancy rate* mencit BALB/c yang dikawinkan semalam secara monogami lebih tinggi dengan sinkronisasi estrus yaitu sebesar 25% dibandingkan tanpa sinkronisasi estrus yaitu sebesar 17%. Akan tetapi tidak ada pengaruh signifikan antara

sinkronisasi estrus dengan kebuntingan yang dilakukan pada perkawinan monogami. Kedua, tidak terdapat perbedaan *pregnancy rate* mencit BALB/c yang dikawinkan semalam secara poligami dengan dan tanpa sinkronisasi estrus, yaitu sebesar 15%. Serta tidak ada pengaruh yang signifikan antara sinkronisasi estrus dengan kebuntingan yang dilakukan pada perkawinan poligami. Ketiga, tidak ada perbedaan *pregnancy rate* yang signifikan antara mencit yang dilakukan sinkronisasi estrus monogami dan poligami. Mencit BALB/c yang dikawinkan semalam dengan sinkronisasi estrus yang dikawinkan secara monogami memiliki kemungkinan untuk bunting lebih tinggi dan memiliki *pregnancy rate* yang paling baik.

Berdasarkan penelitian ini, dirasa perlu untuk dilakukan penelitian lanjutan dengan jaminan faktor internal yang lebih baik (memastikan fertilitas mencit sebelum dikawinkan), serta penelitian tentang perbedaan *pregnancy rate* antara mencit yang dikawinkan poligami dengan berbagai ratio jantan:betina agar dapat diketahui cara mengawinkan yang dapat memperoleh *pregnancy rate* yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Eisen, E.J. 2005. *The Mouse in Animal Genetics and Breeding Research*. London: Imperial College Press.
2. Rabiee, A. R., Lean, I. J. and Stevenson M. A. 2005. *Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: a meta-analysis*. J. Dairy Sci. 88: 2754-2770.
3. Fitrianti. 2002. Efektivitas Penyuntikan Prostaglandin F2 α Alfa Satu Kali dan Dua Kali untuk Sinkronisasi Estrus pada Tikus Putih. (<http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/15244/B02fit.pdf>)
4. Anderson, L.C., Otto G., Coming K.R., Whary M.T., 2015. *Laboratory Animal Medicine*. London: American College of Laboratory Animal Medicine Series.
5. Croy, B.A., Yamada A., DeMayo F.J., Adamson S.L. 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Academic Press.
6. Hrapkiewicz, K., Colby L.A., Denison P., 2007. *Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction*. Oxford: Blackwell.
7. Hood, R.D. 2012. *Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach*. Boca Raton: CRC Press.
8. Mader, S.L, Libal N.L., Coming K.P., Yang R., Murphy S.J. 2009. Refining Timed Pregnancies in Two Strains of Genetically Engineered Mice. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748835/>) diakses 24 Desember 2015)
9. Norris, D.O. 2007. *Vertebrate Endocrinology Fourth Edition*. Burlington: Elsevier Academic Press.