

kw
D.S.K. 35 / 05
f. 10
F

DISERTASI

PERAN SENYAWA OKSIGEN REAKTIF DALAM MEKANISME KERUSAKAN INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA KERBAU LUMPUR HASIL SENTRIFUGASI GRADIEN DENSITAS PERCOLL

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DASRUL

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

**PERAN SENYAWA OKSIGEN REAKTIF DALAM MEKANISME KERUSAKAN
INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA KERBAU LUMPUR HASIL
SENTRIFUGASI GRADIEN DENSITAS PERCOLL**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 15 Februari 2005
Pukul 10.⁰⁰ WIB**

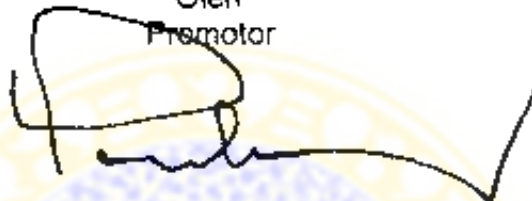
Oleh :

**DASRUL
NIM. 099913649 D**

Lembaran Pengesahan

Disertasi ini telah disetujui
Tanggal **15 Februari 2005**

Oleh
Promotor



Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, drh., MSc.
NIP : 130 189 851

Ko-Promotor I



Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., MSc.
NIP : 130 687 550

Ko-Promotor II



Dr. Sudjarwo, Drs., M.S.
NIP : 131 569 382

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 2 Nopember 2004

PANITIA PENGUJI DISERTASI

- Ketua** : Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr. Sp.Bio
Angota : Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, drh., MSc
: Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., MSc
: Dr. Sudjarwo, Drs. M.S.
: Aucky Hinting, dr., P.hD.
: Prof. Dr. Agus Abadi, dr., SPOG
: Dr. Sunaryo, dr., M.Sc., M.S
: Dr. Nuryadi, Ir., M.S




**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor: 8317/JO3/PP/2004
Tanggal 8 Nopember 2004**

*Allah akan meninggikan derajat
Orang yang beriman dan berilmu pengetahuan*

(QS. 58. Al Mjaddilah 11)

*Mereka menjawab, "Maha Suci Engkau
Tidak, adalah pengetahuan kami kecuali apa
yang telah Engkau ajarkan kepada kami.
Sesungguhnya Engkau lah Yang Maha
Mengetahui lagi Maha Bijaksana"*

(Al Qur'an Surat Al Baqarah ayat 32)



*Karya ini ku persembahkan kepada:
Nusa dan Bangsa
Almamater
Guru-guruku
Orang tua, saudara-saudaraku
Istri dan anak-anakku
Para muridku
Dan peternak*

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur saya panjatkan kehadirat ALLAH SWT Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala limpahan Rahmat dan KurniaNya sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Demikian juga rasa terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranto, drh., M.Sc. selaku promotor yang dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran telah memberi bimbingan, saran, koreksi dan dorongan semangat serta meningkatkan rasa percaya diri saya, sejak saya mengikuti pendidikan Strata 2 dan pendidikan Program Doktor hingga penyelesaian penulisan disertasi ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Dr. Laha Mahaputra, drh., M.Sc. selaku Ko-Promotor-1 dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, koreksi, mengarahkan dan mendidik saya dengan penuh disiplin baik dari segi teori maupun praktis, serta mengembangkan pemikiran yang berwawasan keilmuan sejak saya mengikuti pendidikan Strata 2 dan Pendidikan Program Doktor hingga penyelesaian penulisan disertasi ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr. Sudjarwo, Drs., M.S selaku Ko-Promotor-2 yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, koreksi, mengarahkan dan mendidik saya dengan penuh disiplin baik dari segi teori maupun praktis, serta mengembangkan pemikiran yang berwawasan keilmuan selama Pendidikan Program Doktor hingga penyelesaian penulisan disertasi ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Management Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam Pendidikan Program Doktor hingga penyelesaian penulisan disertasi ini.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., SpB, TKV, serta mantan Rektor Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H, PhD, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., SpP(K) dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soediono Tirtowidarjo, dr., SpTHT., yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Mandoyo Rukmo, drg., MSc., SpKG selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Hj. Juliati Hood A., dr., MS., SpPA., FIAC selaku mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, atas kesabaran dan kesungguhan beliau memberi arahan dan nasehat, sehingga menumbuhkan semangat dan kesabaran pada diri saya dalam menempuh Pendidikan Program Doktor.

Kepada Rektor Universitas Syiah Kuala Banda Aceh, Prof. Dr. Ir. Abdi Wahab, M.Sc., dan mantan Rektor Universitas Syiah Kuala Prof. Dr. Dayan Dawood, SE, M.Sc., (Alm) atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Dr. Mahdi Abrar, drh., MSc. dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Dr. H. Amir Hasan Lubis, drh., MS (Alm) dan drh. Mufti Kamaruddin, MS., yang telah memberi ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Kepada Pemerintah Daerah Tingkat I Nanggroe Aceh Darussalam yang telah memberi bantuan dana sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Ungkapan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada para dosen dan panitia penguji dari ujian kualifikasi sampai ujian usulan

naskah disertasi di Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Purnomo Suryohusodo, dr. Sp B.; Prof. Eddy Pranowo Soedibyo, dr., MPH (Alm); Prof. Dr. H. J. Glinka, SVD; Prof. Bambang Rohino, dr.; Prof. Dr. Soetandyo Wignyo Soebroto, MPA.; Prof. Dr. Koento Wibisono Siswomihardjo; Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS.; Prof. Dr. A. Zainuddin, Drs, Apt.; Prof. Dr. Soehartono Taat Putra, dr., MS.; Widodo J. Pujirahardjo, dr., MS., MPH., DrPH; Siti Pariani, dr., MPH., PhD; Fuad Amsyari, dr., PhD; Dr. L. Dison; Soetjpto, dr., MS., PhD.; Aucky Hinting, dr., PhD.; Mas'ud Hariadi, drh., M.Phil., PhD; Dr. Fedik A. Rantam, drh; Dr. Trinil Susilawati, Ir., MS; Prof. Sutiman B. Sumitro, DSc yang telah menambah pengetahuan dan wawasan keilmuan saya selama mengikuti Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, yang telah memberi kepercayaan kepada saya sebagai peneliti tentang pengembangan seleksi jenis kelamin anak dengan sentrifugasi gradien densitas percoll melalui Dana Penelitian Hibah Bersaing VII/1; VII/2 dan VII/3, sehingga saya dapat melakukan penelitian secara berlanjut.

Terima kasih khususnya kepada Dr. Trinil Susilawati, Ir., MS staf pengajar Pascasarjana Unibraw Malang atas segala bantuan, diskusi dan kerjasamanya dalam pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing IX 1 sampai IX 3 dan pelaksanaan penelitian hingga selesainya penulisan disertasi ini.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Dr. Hary Basuki, dr., MKes., atas segala bimbingan dan bantuannya dalam pengolahan data statistik hingga selesainya penulisan disertasi ini.

Kepada guru-guru saya sejak Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, serta para dosen saya di Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah dan Pascasarjana saya ucapkan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya atas didikan dan bimbingannya. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmad dan hidayahNya.

Terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan pada bapak Kasnawi sekeluarga yang telah dengan senang hati meminjamkan, memelihara ternak kerbau lumpur dan membantu dalam penampungan semen untuk digunakan dalam penelitian ini

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Mbak Surti dan Mbak Ida Prastyawati yang telah membantu saya dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium in vitro fertilisasi Fakultas Kedokteran Hewan Unair.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Kepala dan semua staf laboratorium MAKMAL RSU SOETOMO Surabaya yang banyak membantu saya dalam pelaksanaan penelitian hingga selesai penulisan disertasi ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Biokimia Medik Universitas Brawijaya Malang Dr. Sumarmo DMM SpMK, Dr. Loeki Enggar Fitri, dr., M.Kes., yang telah membantu dalam penyediaan fasilitas laboratorium, serta kepada Mbak Uci, Mbak Afida dan Mas Wibi yang telah banyak membantu pelaksanaan pemeriksaan MDA di laboratorium Biokimia Medik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada bapak Ishak serta semua staf laboratorium Biokimia Fakultas Teknologi Pertanian dan buk Maryani serta semua staf Laboratorium Kimia Organik Universitas Gajah Mada Jogyakarta yang telah memberi izin dalam pelaksanaan pemeriksaan profil asam lemak spermatozoa hingga selesai.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada bapak Penanggung jawab UPT Mikroskop Elektron; Dr. Ketut Suidiana, Drs., MS beserta staf mbak Endah dan mas Mukid, atas segala bantuannya membuat preparat dan pemotretan dalam pemeriksaan Mikroskop Elektron

Kepada Dr. Maryono, Drs., RSL; Dr. David S. Perdana, dr. SpBp; Dr. Juwono dr. SpD; Dr. Sudarti, Dra., M. Kes; Dr. Bambang Guruh Irianto, Ir. A.I.M.,M.M; Dr. A.A. Raka Sudewi,dr., SpS. Ahmad Rudiandiyah, Drs., MSc., Arti Lukitasari, dr. SpM.; Dr. Peter Agus , drg., Sp. BM; Retty Ratnawati, dr., MSc.; Ririh Yudhiastutu, drh., M.Sc.; Titiek Berniyanti, drg. M.Kes.; Tinny Endang Hernowati dr., SpK; Suwarno, drh., MSi; Dr. Sunaryo, S. dr. SpBU; Sujoko Haryadi, dr. MSc; Usman Mulyadi, Drs., M.Kes; Dr. Timbul Supodo, SKM., M.Kes dan Asih Dra., M.Pd. serta rekan-rekan seangkatan saya ucapkan terimakasih

yang tak terhingga atas kebersamaan berbagi rasa suka dan duka, berbagi pengalaman dalam keilmuan serta kerja samanya yang amat baik.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada rekan sejawat Dr. Aulianni, am. drh. DESS; Dr. Sri Wahyuningsih, Ir., M.Si; Suzanita Utama, drh., M.Phil; Dr. Puji Srianto, drh., MS; Dr. Slamet Riady, drh., MSi., Trilas, drh., M.Si., Sri Pantja Madyawati drh., MSi., IGA Wahyu Ardani drg., Mkes., Dr. I. L. Kriswandini, drg., MKes. Dr. Wiwik Henny Winarsih Ir., M.Si. Yogi, drh., M.Si., Abdul Samik drh., M.Si dan Imam Mustofa, drh., MS beserta staf kebidanan dan Kemajiran Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan dorongan semangat dan bantuan kepada saya selama proses penelitian hingga selesainya disertasi ini.

Terima kasih saya haturkan kepada almarhum Hj. Sorini Soehartojo, drh, sekeluarga yang telah memberi dorongan semangat agar saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Dengan rasa cinta dan hormat, saya haturkan terimakasih dan penghargaan yang tiada temilai kepada Ayahanda Darmi (Alm) yang tidak sempat menunggu saya hingga menyelesaikan pendidikan ini dan ibunda Hj. Radhiah yang telah mendidik dan membesarkan saya dengan penuh kasih sayang dan tiada henti mendoakan hingga saya dapat mencapai pendidikan ini. Semoga Allah SWT memuliakan dan selalu melimpahkan kasih sayang kepada beliau sebagaimana beliau menyayangi saya selama ini. Kepada saudara sekandung saya yang tercinta; Ir. Tasman, Dra. Taslimah, Ir. Dasmiasi, Dasniah SH dan Ramanidar Amd. terimakasih atas doa, perhatian dan dorongan semangatnya, tali asih persaudaraan yang ikhlas dan kasih sayang dalam keluarga besar telah memberi makna dalam perjalanan hidup saya. Demikian juga kepada mertua saya Ayahanda H. Idris Ahmad dan ibunda Hj. Rosmaniar yang senantiasa mendoakan akan keberhasilan saya dan memberi nasehat agar saya selalu sabar menghadapi kesulitan.

Ungkapan terima kasih kepada yang terkasih dan tercinta istri saya Ir. Ulfah Sari dengan penuh cinta, kasih sayang dan limpahan kebahagiaan tiada tara. mendoakan, memberi dorongan semangat hingga saya berhasil menyelesaikan disertasi ini. Kedua putra saya ananda Muhammad Fachrul

Ghifary dan Aisyah Dasfania Fitri atas segala pengertian dan doanya, telah memberi semangat saya dalam menempuh Pendidikan Program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Disertasi ini merupakan persembahan cinta saya pada istri dan kedua putra saya tersayang.

Dan masih banyak pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu disini yang membantu dalam terselesainya pendidikan saya. Untuk itu saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dengan tulus dan ikhlas. Akhirnya saya mohonkan doa dihadapan Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, agar melimpahkan rahmadNya kepada semua pihak yang telah membantu saya. Semoga apa yang telah saya persembahkan dapat bermanfaat bagi pengembangan pengetahuan umat manusia. Amin ya robbi alamin.



SUMMARY

The Role Reactive Oxygen Species in mechanism of damage membrane integrity of swamp buffalo sperm after separation by percoll gradient density centrifugation

An Experiment Laboratoric

Dasrul

Percoll gradient density centrifugation is one of methods for separating spermatozoa is done based on the difference in density of spermatozoa X and Y. Besides having ability to separate spermatozoa X and Y, the centrifugation can also induce produce a damage in plasma membrane integrity, leading to the decreased viability of spermatozoa after freezing. One mechanism induced of the damage in plasma membrane integrity after separation with percoll density gradient centrifugation in increased accumulated production oxygen reactive species by spermatozoa.

The objective of this research was to find out an effect of the spermatozoa separation with percoll gradient density centrifugation on the reactive oxygen compound activity and the role in mechanism on the damage in membrane integrity of water buffalo spermatozoa.

Sample for this study fresh semen of the buffalo having good quality (motility more than 70%; concentration more than 600 million/ml, abnormality less than 20% and life percentage more than 80%) were divided into three treatment groups: (1) the control group, namely spermatozoa resulting from swim up without separation with percoll gradient density centrifugation; (2) spermatozoa resulting from separation with percoll gradient density centrifugation for 5 minutes as treatment 1 (P1) and (3) spermatozoa resulting from separation with percoll gradient density centrifugation for 10 minutes as treatment 2 (P2). Addition, analysed of motility spermatozoa is undertaken using BIB Singosari Malang, intact plasma membrane integrity using by Hypoosmotic swelling test (HOS-Test), ultrastructure sperm is observed by using electron scanning. ROS acculation is observed using chemiluminescence method with luminol and peroxidase radish horse enzyme as the probe; MDA level of spermatozoa is observed using thiobarbiturat acid method; while polyunsaturated fatty acid of DHA is observed using gas chromatography (GC) with standard docosahexanoic acide. The collected data in this research were analysed with used one way analysis varians, regression test dan path analysis

The results showed that percentages motility of sperm decreased significantly ($p=0,000$) after percoll gradient density centrifugation. Motility percentages controle is $77,50 \pm 1,85\%$ decrease significantly to $75,25 \pm 2,12\%$ after percoll gradient density centrifugation for 5 minutes ($p=0,049$) and decrease significantly to $73,25 \pm 2,12\%$ after percoll gradient density centrifugation for 10 minutes ($p=0,001$). The percentage motily of sperm after percoll gradient density

centrifugation for 10 minutes decrease no significantly compared with after percoll gradient density centrifugation for 5 minutes ($p=0.096$).

The percentages intact plasma membrane of spermatozoa decreased significantly ($p=0,000$) after percoll gradient density centrifugation. Percentages intact membrane plasma of spermatozoa control is $79.50 \pm 3.21\%$ decreased significantly to $53,25 \pm 5,15\%$ after percoll gradient density centrifugation for 5 minutes ($p=0,001$) and decrease very significantly to $47.50 \pm 4.84\%$ after percoll gradient density centrifugation for 10 minutes ($p=0,000$). The percentages intact membrane plasma of spermatozoa after percoll gradient density centrifugation for 10 minutes lower significantly compared with after percoll gradient density centrifugation for 5 minutes ($p=0.018$).

The ROS accumulation of sperm after separation with percoll density gradient centrifugation increased very significantly ($p=0.000$) compared with the control group. ROS accumulation of sperm control is $6,34 \pm 1,75$ CPM/ 10^8 spermatozoa increase significantly to $14,41 \pm 5,61$ CPM/ 10^8 spermatozoa after percoll gradient density centrifugation for 5 minutes ($p=0.037$) and increase significantly to $18,98 \pm 11,11$ CPM/ 10^8 spermatozoa after percoll gradient density centrifugation for 10 minutes ($p=0.002$). ROS acculation of spermt after percoll gradient dencyty centrifugation for 10 minutes increase no significantly compared with ROS acculation of spermt after percoll gradient dencyty centrifugation for 5 minutes ($p=0.221$).

The level of MDA after separation with percoll density gradient centrifugation, increased very significantly ($p=0.000$) compared with the control group. Level of MDA sperm control is $20,87 \pm 10,32$ nmol/ 10^8 spermatozoa increase significantly to $32,93 \pm 11,35$ nmol/ 10^8 spermatozoa after percoll gradien density centrifugation for 5 minutes ($p=0.031$) and increase of significantly to $37,29 \pm 9,56$ nmol/ 10^8 spermatozoa after percoll gradien density centrifugation for 10 minutes ($p=0.0014$). Level of MDA sperm after percoll gradien density centrifugation for 10 minutes highly no significantly compared with after percoll gradien density centrifugation for 5 minutes ($p=0.412$).

The level of DHA membrane decreased after separation with the percoll density gradient centrifugation decrease significantly ($p=0,000$) compared with the control group. Level of DHA membrane control was $42,61 \pm 6,76$ $\mu\text{g}/\text{ml}/10^8$ spermatozoa decrease significantly to $24,57 \pm 7,09$ $\mu\text{g}/10^8$ spermatozoa after percoll gradien density centrifugation for 5 minutes ($p=0,018$) and decrease to $19,26 \pm 6,68$ $\mu\text{g}/10^8$ spermatozoa after percoll gradien density centrifugation for 10 minutes ($p=0,000$). Level of DHA membrane after percoll gradien density centrifugation for 10 minutes lower no significantly compared with after percoll gradien density centrifugation for 5 minutes ($p=0.136$).

The regression result shows that ROS accumulation influenced positively on level of MDA ($r=0,757$; $p<0,01$), influenced negatively on level of DHA membrane degree and intact plasma membrane percentage ($r=-0,542$; $p<0,01$ and $r=-0,655$; $p<0,01$). Level of MDA influenced negatively on level of DHA membrane ($r=-0,527$; $p<0,01$) and intact plasma membrane percentage ($r=-0,671$; $p<0,01$). Level of DHA membran influenced on intact plasma membrane percentage

($r=0,788$; $p<0,01$). Meanwhile the path analysis result showed that ROS accumulation influencing level of MDA significantly ($p<0,05$) with coefficient path value (0,67) and influencing level of DHA significantly ($p<0,05$) with coefficient path value (-0,54). Level of DHA influencing level of MDA no significantly ($p>0,05$) with coefficient path value (-0,17) and influencing level of percentage intact plasma membrane significantly ($p<0,05$) with coefficient path value (0,60). Level of MDA influencing percentage intact plasma membrane significantly ($p<0,05$) with coefficient path value (-0,35). Increased level of MDA and decreased level of DHA influenced directly by increased accumulation of ROS. So, increase of ROS accumulation caused the increase of level MDA and decrease level of DHA membrane and which is finally decrease intact plasma membrane percentage of swamp buffalo sperm.

It can be concluded that sperm separation by percoll gradient density centrifugation can increase of ROS accumulated, level of MDA, decrease of DHA membrane and intact plasma membrane percentages of swamp buffalo sperm. The increases of ROS accumulation, level of MDA, decrease of DHA membrane and intact plasma membrane percentages of swamp buffalo sperm after percoll gradient density centrifugation for 5 minutes different no significantly compared with after percoll gradient density centrifugation for 10 minutes. ROS accumulation influenced intact plasma membrane percentage by decrease level of DHA membrane and increase level of MDA. The percentage intact plasma membrane influenced directly by decrease level of DHA and increase level of MDA. Decrease level of DHA and increase level of MDA influenced by ROS accumulation.

motilitas spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih rendah dibandingkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit. Akumulasi ROS mempengaruhi persentase MPU spermatozoa secara tidak langsung terutama melalui peningkatan kadar MDA dan penurunan kadar DHA membran. Kadar MDA dan kadar DHA berpengaruh secara langsung terhadap penurunan persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.



ABSTRACT

The role reactive oxygen species in mechanism of damage membrane integrity of swamp buffalo sperm after separation by percoll gradient density centrifugation

Study Experiment Laboratoric

Dasrul

The objective of this research was to find out the effect of separation of swamp buffalo sperm by using percoll gradient density centrifugation on the the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the role in mechanism of damage of integrity membrane of sperm

The research is a laboratory study using a true experimental design, used swamp buffalo of sperm divided into 3 groups i.e (no centrifugation/ control; percoll density gradient centrifugation for 5 minutes and percoll density gradient centrifugation for 10 minutes). Measurement were conducted on the level of ROS accumulation, level of malondialdehyde (MDA), of docoxahexanoic acid (DHA) and percentage intact plasma membrane. The collected data in this research were analysed with analysis varians, regression dan path analysis

These result showed that separation of sperm by percoll gradient density centrifugation could increase of ROS accumulation and the level of MDA significantly ($p < 0.01$), while the level of DHA membrane and percentage intact plasma membrane sperm decrease significantly ($p < 0,01$). The increase of ROS accumulation, level of MDA and decrease of DHA and percentage of intact plasma membrane were significantly higher on after centrifugation gradient percoll density for 10 minutes than percoll gradien density centrifugation for 5 minutes.

The path analysis of ROS accumulation, level of MDA and level of DHA membrane influenced toward the percentage of membrane plasma intact of sperm. The of percentage intact plasma membran influenced by the level of MDA and level of DHA membrane significantly ($p < 0,01$). The level of MDA and level of DHA membrane was influenced by level of ROS accumulation significantly ($p < 0,01$).

It can be concluded that sperm separation of percoll density gradient centrifugation increase of ROS accumulation, level of MDA, decrease of DHA membrane and persentages of intact plasma membran. The of ROS accumulation has effect to the damage of membran plasma integrity by increase of lipid peroxydation and decrease of DHA membran of sperm.

Key words : sperm of swamp buffalo, percoll gradient density centrifugation, ROS, MDA, DHA membrane of sperm and intact plasma membrane

RINGKASAN

Peran Senyawa Oksigen Reaktif dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Eksperimental Laboratoris

Dasrul

Sentrifugasi gradien densitas percoll merupakan salah satu metode pemisahan spermatozoa yang dilakukan dengan cara pemutaran spermatozoa dalam medium percoll dengan berbagai tingkat densitas pada kecepatan dan waktu tertentu. Selain dapat memisahkan populasi spermatozoa X dan spermatozoa Y, sentrifugasi gradien densitas percoll, juga dapat menginduksi pembentukan ROS oleh spermatozoa. Dalam konsentrasi normal ROS berperan sebagai mediator penting terhadap fungsi spermatozoa termasuk hiperaktivasi, kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa, namun dalam konsentrasi yang berlebihan dapat menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan integritas membran spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan pengaruh pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap akumulasi produksi ROS dan perannya terhadap mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur.

Sampel penelitian ini adalah semen segar kerbau lumpur yang memiliki kualitas baik (motilitas diatas 70 %; konsentrasi diatas 600 juta /ml, abnormalitas kurang dari 20 % dan persentase hidup lebih dari 80 %), yang dibagi dalam tiga kelompok perlakuan yaitu; 1) kelompok spermatozoa tanpa perlakuan sentrifugasi sebagai kontrol (K), 2) spermatozoa hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit (P₁) dan 3) spermatozoa hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit (P₂). Selanjutnya dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa dengan metode yang biasa digunakan pada Balai Inseminasi Buatan (BIB), integritas membran plasma utuh dengan uji *Hypoosmotic swelling test (HOS-test)*, ultrastruktur membran spermatozoa diamati dengan mikroskop elektron scanning, tingkat akumulasi ROS spermatozoa dilakukan dengan metode *chemiluminescence*, menggunakan luminol dan horse radish peroxidase sebagai probe, kadar MDA dengan metoda *thiobarbituric acid (TBA) test* dan kadar DHA membran dengan *Gas Chromatography/GC* dengan menggunakan DHA standart. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisa varian satu arah untuk melihat perbedaan antar perlakuan, uji regresi dan analisis jalur untuk melihat pengaruh antar variable penelitian.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll menurun secara sangat bermakna ($p=0,000$) pada kedua kelompok lama waktu sentrifugasi dibandingkan dengan kontrol. Rerata persentase motilitas

spermatozoa kontrol dan setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan 10 menit secara berturut-turut adalah $77,25 \pm 1,85\%$; $75,25 \pm 2,12\%$ dan $73,38 \pm 2,45\%$. Hasil analisis statistik menggunakan uji LSD menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa kontrol lebih tinggi secara bermakna ($p=0,049$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,001$) dibandingkan dengan setelah perlakuan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 menit. Rerata persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 menit lebih tinggi secara tidak bermakna ($p=0,096$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 menit.

Rerata persentase MPU spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll menurun secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Rerata persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan 10 menit secara berturut-turut adalah $79,50 \pm 3,21\%$; $53,25 \pm 5,15\%$ dan $47,50 \pm 4,84\%$. Hasil analisis statistik menggunakan uji LSD menunjukkan bahwa rerata persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur kontrol lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 menit maupun dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 menit. Sedangkan rerata persentase MPU spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,018$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 menit.

Rerata akumulasi produksi ROS spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat secara sangat bermakna ($p=0,000$) pada kedua kelompok lama waktu sentrifugasi dibandingkan dengan kontrol. Rerata akumulasi produksi ROS spermatozoa kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan 10 menit secara berturut-turut adalah $6,34 \pm 1,75$ CPM/ 10^8 spermatozoa; $14,41 \pm 5,61$ CPM/ 10^8 spermatozoa dan $18,98 \pm 11,11$ CPM/ 10^8 spermatozoa. Hasil analisis statistik menggunakan uji LSD menunjukkan bahwa rerata akumulasi produksi ROS spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 menit lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,002$) dibandingkan dengan spermatozoa kontrol, akan tetapi lebih tinggi secara tidak bermakna ($p=0,221$), dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 menit. Sedangkan rerata akumulasi produksi ROS spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,037$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 menit.

Rerata kadar MDA spermatozoa setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat secara sangat bermakna ($p=0,014$) dibandingkan dengan kontrol. Rerata kadar MDA spermatozoa kelompok kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan 10 menit secara berturut-turut adalah $20,87 \pm 10,32$ nmol/ 10^8

spermatozoa; $32,93 \pm 11,36 \text{ nmol}/10^8$ spermatozoa dan $37,29 \pm 9,56 \text{ nmol}/10^8$ spermatozoa. Hasil analisis statistik menggunakan uji LSD menunjukkan bahwa rerata kadar MDA spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,014$) dibandingkan dengan kontrol, akan tetapi lebih tinggi secara tidak bermakna ($p=0,412$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Sedangkan rerata kadar MDA spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,031$) dibandingkan dengan spermatozoa kontrol.

Rerata kadar DHA spermatozoa setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll menurun secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Rerata kadar DHA spermatozoa kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan 10 menit secara berturut-turut adalah $42,61 \pm 6,76 \mu\text{g}/10^8$ spermatozoa; $24,57 \pm 7,09 \mu\text{g}/10^8$ spermatozoa dan $19,26 \pm 6,68 \mu\text{g}/10^8$ spermatozoa. Hasil analisis statistik menggunakan uji LSD menunjukkan bahwa rerata kadar DHA membran spermatozoa kontrol lebih tinggi secara bermakna ($p=0,018$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit. Sedangkan kadar DHA membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara tidak bermakna ($p=0,136$) dibandingkan dengan kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit.

Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa akumulasi produksi ROS berpengaruh secara positif terhadap kadar MDA ($r=0,757$, $p<0,01$), sebaliknya berpengaruh negatif terhadap kadar DHA dan persentase MPU spermatozoa ($r= -0,542$; $p<0,01$ dan $r= -0,655$; $p<0,01$). Kadar MDA berpengaruh negatif dengan kadar DHA spermatozoa ($r= -0,527$; $p<0,01$) dan persentase MPU ($r= -0,671$; $p<0,01$). Kadar DHA berpengaruh positif dengan persentase MPU ($r= 0,788$; $p<0,01$). Sedangkan hasil analisis jalur (*path analysis*) menunjukkan bahwa akumulasi produksi ROS mempengaruhi kadar MDA secara sangat bermakna ($P<0,01$) dengan koefisien jalur (0,67) dan mempengaruhi kadar DHA secara bermakna ($p<0,05$) dengan koefisien jalur (-0,54). Kadar DHA mempengaruhi kadar MDA secara tidak bermakna ($p>0,05$) dengan koefisien jalur yang sangat kecil (-0,17) dan mempengaruhi persentase MPU secara sangat bermakna ($p<0,01$) dengan koefisien jalur (0,60). Kadar MDA mempengaruhi persentase MPU spermatozoa secara bermakna ($p<0,05$) dengan koefisien jalur (-0,35). Peningkatan kadar MDA dan penurunan kadar DHA membran spermatozoa dipengaruhi oleh akumulasi ROS. Jadi bila akumulasi ROS meningkat maka kadar MDA meningkat, kadar DHA membran menurun dan akhirnya persentase MPU menjadi menurun.

Penelitian dapat disimpulkan bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat meningkatkan akumulasi ROS dan peroksidasi lipid, menurunkan kadar DHA membran, persentase integritas membran plasma utuh (MPU) dan motilitas spermatozoa kerbau lumpur. Tingkat akumulasi ROS, peroksidasi lipid, penurunan kadar DHA, persentase MPU dan

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Sampul Depan.....	i
Halaman Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat gelar.....	iii
Lembaran Pengesahan	iv
Penetapan Panitia Penguji	v
Ucapan terimakasih	vii
RINGKASAN.....	xii
SUMMARY.....	xvi
ABSTRACT.....	xxiv
DAFTAR ISI	xx
DAFTAR TABEL	xxiv
DAFTAR GAMBAR	xxvi
DAFTAR LAMPIRAN	xxviii
DAFTAR SINGKATAN	xxx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian	10
1.4 Manfaat Penelitian	11
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	13
2.1 Tinjauan Umum Kerbau lumpur	13
2.2 Karakteristik Semen kerbau lumpur.....	14
2.2.1 Plasma seminalis Spermatozoa kerbau lumpur	16
2.2.2 Spermatozoa kerbau lumpur	18
2.2.2.1 Kepala.....	20
2.2.2.2 Leher	21
2.2.2.3 Ekor.....	22
2.2.3 Struktur dan Fungsi Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur.....	24
2.2.3.1 Fosfolipid.....	26
2.2.3.2 Kolesterol.....	29
2.3 Pemisahan Spermatozoa X dan Y.....	30
2.4 Pemisahan spermatozoa dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	33
2.4.1 Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Integritas membran spermatozoa	36
2.4.2 Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Pembentukan Senyawa Oksigen Reaktif.....	38
2.5 Radikal Bebas dan Senyawa Oksigen Reaktif	41

2.5.1	Radikal Bebas	42
2.5.2	Senyawa Oksigen Reaktif (<i>reactive oxygen species/ROS</i>)	44
2.5.2.1	Radikal Superoksida anion ($O_2^{\bullet -}$)	47
2.5.2.2	Radikal Hidroksil (OH^{\bullet}).....	49
2.5.2.3	Radikal Peroksil (RO_2^{\bullet}) dan Radikal Alkoksil (RO^{\bullet})	50
2.5.2.4	Hidrogen Peroksida (H_2O_2).....	51
2.5.2.5	Singlet Oksigen (1O_2).....	52
2.5.2.6	Ozon (O_3).....	53
2.6	Antioksidan	53
2.6.1	Superoksida Dismutase (SOD)	56
2.6.1.1	Manganese Superoksida Dismutase (Mn-SOD).....	57
2.6.1.2	Copper, Zinc Superoksida Dismutase (Cu, Zn-SOD)	57
2.6.1.3	Superoksida Dismutase Ekstraseluler (Ec-SOD)	58
2.6.2	Katalase	60
2.6.3	Golongan Glutathion Peroksidase (GPx).....	62
2.7	Pengaruh ROS terhadap Fungsi Spermatozoa.....	64
2.7.1	Peroksidasi lipid pada membran Spermatozoa	66
2.7.2	Kerusakan Protein Spermatozoa	71
2.7.3	Kerusakan DNA Spermatozoa	73
2.7.4	Penurunan motilitas spermatozoa	74
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	76
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	76
3.2	Hipotesis Penelitian	79
BAB 4	METODE PENELITIAN	81
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	81
4.2	Populasi, Sampel dan Besar Sampel.....	82
4.2.1	Populasi Penelitian.....	82
4.2.2	Sampel Penelitian	82
4.2.3	Besar Sampel Penelitian	82
4.3	Variabel Penelitian.....	83
4.3.1	Identifikasi Variabel Penelitian	83
4.3.2	Definisi Variabel Penelitian.....	84
4.4	Bahan dan Peralatan Penelitian	87
4.4.1	Bahan Penelitian	87
4.4.1.1	Bahan Biologis	87
4.4.1.2	Bahan Kimia.....	87
4.4.2	Peralatan Penelitian	88
4.5	Tempat dan Waktu Penelitian	90

4.6	Prosedur Pengumpulan Data	90
4.6.1	Penampungan Semen.....	90
4.6.2	Pemisahan Spermatozoa dengan Sentrifugasi Gradien densitas percoll	92
4.6.3	Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa	94
4.6.4	Pemeriksaan Konsentrasi Spermatozoa	95
4.6.5	Pemeriksaan Integritas Membran Plasma Utuh Spermatozoa	95
4.6.6	Pemeriksaan Akumulasi ROS Spermatozoa	96
4.6.7	Pemeriksaan Kadar Malondialdehide (MDA) Spermatozoa.....	97
4.6.8	Pemeriksaan Profil Asam Lemak DHA Spermatozoa.....	98
4.7	Analisis Data	100
BAB 5	HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	102
5.1	Data Kualitas Semen Segar Kerbau lumpur	102
5.2	Data Deskriptif Variabel Penelitian	103
5.2.1	Persentase Motilitas Spermatozoa Kerbau lumpur	103
5.2.2	Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Kerbau lumpur	104
5.2.3	Akumulasi Produksi ROS Spermatozoa Kerbau lumpur.....	108
5.2.4	Kadar Molonaldioldehide (MDA) Spermatozoa Kerbau lumpur	109
5.2.5	Profil Asam Lemak Membran Spermatozoa Kerbau lumpur.....	110
5.3	Hasil Analisis Data Penelitian	113
5.3.1	Uji Normalitas Data Penelitian.....	113
5.3.2	Uji Homogenitas Varian	114
5.4	Hasil Analisis Variabel Tergantung	115
5.4.1	Analisis Statistik Persentase Motilitas Spermatozoa	115
5.4.2	Analisis Statistik Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa	116
5.4.3	Analisis Statistik Akumulasi Produksi ROS Spermatozoa	118
5.4.4	Analisis Statistik Kadar MDA Spermatozoa	119
5.4.5	Analisis Statistik Kadar DHA membran Spermatozoa	121
5.4.6	Analisis Statistik Pengaruh Akumulasi ROS, kadar MDA, kadar DHA dan Persentase MPU Spermatozoa	123

5.4.6.1	Pengaruh Akumulasi produksi ROS terhadap kadar MDA Spermatozoa.....	123
5.4.6.2	Pengaruh Akumulasi produksi ROS terhadap kadar DHA membran Spermatozoa.. ..	124
5.4.6.3	Pengaruh Akumulasi produksi ROS terhadap Persentase MPU Spermatozoa.....	124
5.4.6.4	Pengaruh kadar MDA terhadap kadar DHA membran Spermatozoa.....	125
5.4.6.5	Pengaruh kadar MDA terhadap Persentase MPU Spermatozoa...	126
5.4.6.6	Pengaruh kadar DHA terhadap persentase MPU Spermatozoa...	127
5.4.7	Analisis Jalur Pengaruh Akumulasi ROS, kadar MDA, kadar DHA dan Persentase MPU Spermatozoa	127
BAB 6	PEMBAHASAN	131
6.1	Kuantitas semen segar Kerbau lumpur	131
6.2	Pengaruh sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Integritas Membran Plasma Spermatozoa Kerbau lumpur.....	136
6.3	Pengaruh sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau lumpur	142
6.4	Pengaruh sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap tingkat Peroksidasi Lipid Spermatozoa Kerbau lumpur	147
6.5	Pengaruh sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Kadar DHA Membran Spermatozoa Kerbau lumpur	151
6.6	Jalur Hubungan Akumulasi produksi ROS, MDA dan DHA dengan Integritas Membran Plasma Spermatozoa setelah Pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	155
BAB 7	PENUTUP.....	164
7.1	Simpulan	164
7.2	Saran.....	165
	DAFTAR PUSTAKA.....	167
	LAMPIRAN	181

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbandingan bahan organik plasma semen Kerbau lumpur dengan sapi	15
Tabel 5.1 Kualitas Semen Segar Kerbau lumpur yang digunakan dalam penelitian.....	102
Tabel 5.2 Rerata dan Simpangan baku Persentase Motilitas Spermatozoa Kerbau lumpur Kontrol dan Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll.....	103
Tabel 5.3 Rerata dan Simpangan baku Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Kerbau lumpur Kontrol dan Perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	104
Tabel 5.4 Rerata dan Simpangan baku Akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau lumpur Kontrol dan Perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	108
Tabel 5.5 Rerata dan Simpangan baku kadar MDA Spermatozoa Kerbau lumpur Kontrol dan Perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	109
Tabel 5.6 Rerata dan Simpangan baku kadar DHA Spermatozoa Kerbau lumpur Kontrol dan Perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	112
Tabel 5.7 Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov data Variabel Penelitian	113
Tabel 5.8 Hasil Uji Homogenitas Varians Data Variabel Penelitian	114
Tabel 5.9 Hasil Analisis Varian Satu Arah Persentase Motilitas Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	115
Tabel 5.10 Hasil Uji LSD Persentase Motilitas Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	116
Tabel 5.11 Hasil Analisis Varian Satu Arah Persentase MPU Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	117
Tabel 5.12 Hasil Uji LSD Persentase MPU Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	117

Tabel 5.13	Hasil Analisis Varian Satu Arah Akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll ...	118
Tabel 5.14	Hasil Uji LSD Akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	119
Tabel 5.15	Hasil Analisis Varian Satu Arah Kadar MDA Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll ...	120
Tabel 5.16	Hasil Uji LSD Kadar MDA Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	120
Tabel 5.17	Analisis Varian Satu Arah Kadar DHA Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	121
Tabel 5.18	Hasil Uji LSD Kadar DHA Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	122



DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1A	Struktur Morfologi Spermatozoa Mammalia Utuh.....	19
Gambar 2.1B	Pemotongan Sagital Kepala Spermatozoa Mammalia dengan berbagai bagian anatomisnya	19
Gambar 2.2	Struktur molekuler fosfolipid lapis ganda dari membran sel	27
Gambar 2.3	Gambaran Spermatozoa setelah pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll yang diamati dengan mikroskop electron scanning	37
Gambar 3.1	Gambaran Kerangka Konseptual Penelitian	70
Gambar 4.1	Persiapan Penampungan Semen Menggunakan Vagina Buatan	91
Gambar 4.2	Tabung berisi suspensi spermatozoa kontrol dan hasil sentrifugasi gradien densitas percoll	93
Gambar 4.3	Skematis Operasional penelitian.....	101
Gambar 5.1	Histogram rerata persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan kelompok perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	104
Gambar 5.2	Histogram Rerata Persentase MPU Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan kelompok Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	105
Gambar 5.3	Integritas Membran Plasma Utuh Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol yang diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 X	106
Gambar 5.4	Integritas Membran Plasma Utuh Spermatozoa Kerbau Lumpur kelompok perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll yang diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 X	106
Gambar 5.5.	Gambaran Morfologi Kepala Spermatozoa Kerbau Lumpur potongan melintang Hasil Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll yang diamati dengan mikroskop electron transmisi pembesaran 15000 X.	107
Gambar 5.6	Histogram rerata Akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	109

Gambar 5.7	Histogram rerata Kadar MDA Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan Perlakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	110
Gambar 5.8	Kromatogram Asam Lemak DHA membran Spermatozoa Kerbau Lumpur yang diamati dengan menggunakan Gas Kromatografi	111
Gambar 5.9	Histogram rerata Kadar DHA Spermatozoa Kerbau Lumpur Kontrol dan Periakuan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	113
Gambar 5.10	Garis linier pengaruh Akumulasi ROS terhadap kadar MDA Spermatozoa.	123
Gambar 5.11	Garis linier pengaruh Akumulasi ROS terhadap kadar DHA spermatozoa	124
Gambar 5.12	Garis linier pengaruh Akumulasi ROS terhadap persentase MPU spermatozoa	125
Gambar 5.13	Garis linier pengaruh kadar MDA terhadap kadar DHA spermatozoa	126
Gambar 5.14	Garis linier pengaruh kadar MDA terhadap persentase MPU spermatozoa	126
Gambar 5.15	Garis linier pengaruh kadar DHA terhadap persentase MPU spermatozoa	127
Gambar 5.16	Skematis hasil analisis uji jalur (path analisis) antara ROS, SOD, MDA, DHA dan MPU Spermatozoa yang diamati berdasarkan nilai Loading Factor (P).....	128
Gambar 5.17	Skematis hasil analisis uji jalur (path analisis) antara ROS, SOD, MDA, DHA dan MPU Spermatozoa yang diamati berdasarkan nilai t (t value).....	129

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Pembuatan reagensia..... 181
Lampiran 2	Bagan pemeriksaan ultrastruktur spermatozoa dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi..... 183
Lampiran 3	Bagan Pemeriksaan Ultrastruktur Spermatozoa dengan menggunakan mikroskop elektron scanning..... 185
Lampiran 4	Prosedur pemeriksaan ROS Spermatozoa dengan metode Chemiluminiscence..... 186
Lampiran 5	Prosedur Kerja Pemeriksaan Kadar Malondialdehyde (MDA) 187
Lampiran 6	Skematis Pemeriksaan Profil Asam Lemak Spermatozoa 189
Lampiran 7	Hasil Perhitungan Kadar DHA Spermatozoa 190
Lampiran 8	Rekapitulasi Data kualitas semen segar kerbau lumpur yang digunakan pada penelitian 191
Lampiran 9	Rekapitulasi Data Penelitian Pemisahan Spermatozoa Kerbau Lumpur dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll 192
Lampiran 10	Analisis Statistik Normalitas dan Homogenitas Data Penelitian 194
Lampiran 11	Analisis Varian satu arah Persentase Motilitas Spermatozoa Kerbau Lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll 196
Lampiran 12	Analisis Varian satu arah Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Kerbau Lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll 197
Lampiran 13	Analisis Varian satu arah Akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau Lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll 198
Lampiran 14	Analisis Varian satu arah kadar MDA Spermatozoa Kerbau Lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll 199

Lampiran 15	Analisis Varian satu arah kadar DHA Spermatozoa Kerbau lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	200
Lampiran 16	Analisis korelasi akumulasi produksi ROS,MDA, DHA dan MPU spermatozoa hasil pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll ...	201
Lampiran 17	Analisis Regresi Akumulasi ROS terhadap MDA Spermatozoa Kerbau Lumpur.....	202
Lampiran 18	Analisis Regresi Akumulasi ROS terhadap DHA Spermatozoa Kerbau Lumpur.....	203
Lampiran 19	Analisis Regresi Akumulasi ROS terhadap MPU Spermatozoa Kerbau Lumpur.....	204
Lampiran 20	Analisis Regresi kadar MDA terhadap DHA Spermatozoa Kerbau Lumpur.....	205
Lampiran 21	Analisis Regresi kadar MDA terhadap MPU Spermatozoa Kerbau Lumpur.....	206
Lampiran 22	Analisis Regresi kadar DHA terhadap MPU Spermatozoa Kerbau Lumpur.....	207

DAFTAR SINGKATAN

AA	: Arachidonate Acid
AGE	: Advanced Glycosylated Endproduct
AMDF	: Anti Mullerian Duct Factor
ATP	: Adenosine Triphosphate
BSA	: Bovine Serum Albumin
C/PL	: Cholesterol / Phospholipid
CPM	: Count per Minute
CTC	: Chlortetracycline Assay
CTC)	: Chlortetracycline
DAG	: Diacylglycerol
DHA	: Docosahexanoic Acid
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNA	: Deoxyribo Nucleat Acid
EBS	: Estrous Buffalo Serum
EBSS	: Earle's Balanced Salt Solution
FAD	: Flavin Adenine Dinucleotide
FCS	: Foetal Calf Serum
FMLP	: Formyl- Methionyl-Leucyl-phenylalanine
FMN	: Flavin Mononucleotide
G ₆ PD	: Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
GC	: Gas Chromatography
GSH	: Glutation
GSPx	: Glutation Peroksidase
HOST	: Hypo Osmotic Swelling Test
IB	: Inseminasi Buatan
LC	: Lysophosphatidyl Choline
LOOH	: Lipid hidroperoksida
MDA	: Malondialdehyde
MPU	: Membran Plasma Utuh
NAD ⁺	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	: Nicotinamida-Adenine Dinucleotide : Phosphate
NBT	: Nitroblue Tetrazolium
OXPHOS	: Oxydative Phosphorylation
PBS	: Phosphate Buffer Solution
PC	: Phosphatidil Choline
PUFA	: Poly Unsaturated Fatty Acid
ROS	: Reactive Oxygen Species
SH	: Sulfhidril
SOD	: Superoxyde Dismutase
SOD	: Superoksida Dismutase
TBA	: Thiobarbiturate Acid
TCA	: Trichloro acetic Acid
TDF	: Testis Determining Factor
TE	: Transfer Embrio
TLC	: Thin Layer Chromatography
ZP3	: Zona Pellusida 3

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Masalah

Kerbau lumpur (*swamp buffalo*) atau kerbau sawah merupakan salah satu jenis ternak ruminansia lokal yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Selain karena keunggulannya sebagai ternak kerja dan sumber protein hewani, kerbau lumpur juga berperan penting dalam adat istiadat dan kepercayaan berbagai suku di Indonesia khususnya suku minang di Sumatra Barat dan suku Toraja di Sulawesi Tengah. Namun demikian populasi ternak kerbau lumpur di Indonesia cenderung menurun dari tahun ketahun. Berdasarkan laporan Direktorat Jendral Peternakan tahun 2002, populasi ternak kerbau lumpur di Indonesia pada tahun 2000 berjumlah 2.812.400 ekor, jumlah ini jauh menurun dibandingkan dari pada tahun 1995 yaitu 3.104.000 ekor. Mengingat pentingnya peran ternak kerbau lumpur dalam kehidupan masyarakat, sehingga perlu dilestarikan kemumiannya dan ditingkatkan produktivitasnya.

Salah satu upaya peningkatan produktivitas ternak kerbau lumpur yang efektif dan efisien adalah melalui penerapan bioteknologi reproduksi Inseminasi Buatan (IB). Penerapan bioteknologi reproduksi IB akan lebih berdayaguna bila anak yang dilahirkan dapat ditentukan jenis kelaminnya sesuai dengan tujuan peternakan, misalnya pada peternakan susu lebih mengharapkan anak betina, sedangkan untuk peternakan potong lebih mengharapkan anak jantan. Dari segi ekonomi, preseleksi jenis kelamin

anak lebih menguntungkan, selain dapat menekan biaya pemeliharaan, juga dapat menunjang program *breeding* dalam pemilihan bibit unggul. Untuk mencapai tujuan tersebut dapat dilakukan melalui inseminasi dengan spermatozoa yang sudah dipisahkan kromosom seksnya. Pada mammalia, spermatozoa yang berkromosom X bila membuahi sel telur akan menghasilkan anak betina, sedangkan spermatozoa yang berkromosom Y bila membuahi sel telur akan menghasilkan anak jantan (Hafez, 2000).

Sentrifugasi gradien densitas percoll merupakan salah satu metode pemisahan spermatozoa berkromosom X dan spermatozoa berkromosom Y yang dilakukan dengan cara pemutaran spermatozoa dalam tabung yang berisi medium percoll dalam berbagai tingkat densitas pada kecepatan dan waktu tertentu. Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinuous didasarkan atas perbedaan densitas kedua macam spermatozoa. Spermatozoa berkromosom X mempunyai densitas yang lebih tinggi dibandingkan spermatozoa berkromosom Y bila disentrifugasi dengan gradien densitas percoll cenderung lebih cepat turun kelapisan bawah. Telah terbukti bahwa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll, populasi spermatozoa berkromosom X yang diperoleh pada lapisan bawah lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan populasi spermatozoa berkromosom Y. Sebaliknya populasi spermatozoa berkromosom Y yang diperoleh pada lapisan atas lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan populasi spermatozoa berkromosom X (Kaneko *et al.*, 1983; Safei, 1990; Susilawati

dkk., 1996; Watkins *et al.*, 1996; Mirajuddin, 1997; Mahaputra dkk., 1998; Hossifien *et al.*, 1999 dan Kobayashi *et al.*, 2003).

Hasil penelitian Susilawati dkk. (1996) menunjukkan bahwa pemisahan spermatozoa sapi *Frisian Holstein* (FH) dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinuous 10 tingkat (densitas 1,027 – 1,070 g/ml) pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit, diperoleh pada lapisan bawah populasi spermatozoa berkromosom X sebanyak 83,1 % dan spermatozoa berkromosom Y sebanyak 16,9 %. Setelah inseminasi pada induk betina, didapatkan anak yang lahir berjenis kelamin betina sebanyak 82,5 % (33/40) dan berjenis kelamin jantan sebanyak 18,3% (7/40). Hasil yang hampir sama juga dilaporkan Dasrul dkk. (1999) pada spermatozoa kerbau lumpur yang dipisahkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 tingkat (1,030 – 1,070 g/ml) pada kecepatan 2250 rpm (850 x G) selama 10 menit, diperoleh pada lapisan bawah populasi spermatozoa berkromosom X sebanyak $83,33 \pm 3,78$ % dan populasi spermatozoa berkromosom Y sebanyak $16,67 \pm 4,12$ %, setelah fertilisasi *in vitro* (FIV) didapatkan $72,56 \pm 6,37$ % embrio berjenis kelamin betina dan $27,43 \pm 3,83$ % embrio berjenis kelamin jantan. Namun demikian spermatozoa hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll memperlihatkan adanya penurunan daya fertilitas dan kurang tahan pada proses pembekuan. Hasil pemeriksaan *hypoosmotic swelling test* (HOS-Test) yang diamati dengan mikroskop cahaya terlihat adanya kerusakan integritas membran spermatozoa

Kerusakan integritas membran spermatozoa akibat pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll sudah pernah dilaporkan sebelumnya. Brandeis and Manuel. (1993) menemukan adanya penurunan yang bermakna persentase membran plasma utuh spermatozoa manusia setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinuos pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Susilawati (2000) menemukan adanya kerusakan struktur dan fungsi membran spermatozoa sapi Bali setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontineus 10 tingkat pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit. Akan tetapi bagaimana mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll sampai saat ini belum sepenuhnya terungkap, sehingga menjadi kendala dalam pencegahannya.

Teori tentang mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa akibat pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll bersifat multifactor dan beberapa diantaranya belum diketahui. Gesekan mekanik membran spermatozoa dengan partikel percoll dan dinding tabung serta terpisahnya spermatozoa dengan plasma seminalis selama sentrifugasi dilaporkan dapat menyebabkan kerusakan integritas membran spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll (Brandeis and Manuel, 1993; Check *et al.*, 1999 dan Susilawati, 2000). Disamping itu meningkatnya akumulasi produksi senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species /ROS*) oleh spermatozoa belakangan juga telah dihubungkan dengan menurunnya

integritas membran spermatozoa manusia setelah sentrifugasi gradien densitas percoll (Iwazaki and Gagnon, 1992; Ding *et al.*, 1999; dan Ollero *et al.*, 2001). Namun sejauh mana peran ROS dalam mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll belum diketahui dengan jelas.

ROS merupakan sekelompok senyawa oksigen yang bersifat reaktif dan dapat merusak berbagai komponen sel yang ada disekitarnya dengan cara menarik atau memberi satu elektron dari/ke molekul tersebut (Halliwell and Gutteridge, 1993). ROS terbukti dapat menyebabkan disfungsi sel melalui perubahan fungsi protein struktur (enzim, reseptor, antibody, pembentukan matrik dan sitoskeleton), rantai DNA (*deoxyribonucleic acid*) dan membran sel, sehingga integritas sel menjadi terganggu (Hughes *et al.*, 1998; Donnelly *et al.*, 1999; Sikkas *et al.*, 2000, Suryohudoyo, 2000 dan Agarwal *et al.*, 2003).

ROS yang terlibat dalam berbagai proses biologis sel termasuk spermatozoa sebagian besar justru berasal dari proses metabolisme alami yang melibatkan oksigen, yaitu suatu senyawa yang diperlukan oleh semua organisme aerobik untuk menghasilkan *adenosine triphosphate* (ATP), melalui proses fosforilasi oksidatif (*oxidative phosphorylation / OXPHOS*) di mitokondria. Dalam keadaan normal sekitar 85 - 90 % oksigen diperlukan untuk menghasilkan ATP dan 3 - 5 % dari oksigen tersebut, direduksi secara univalen menjadi ROS di mitokondria (Halliwell and Gutteridge, 1999). ROS dalam konsentrasi rendah berperan penting sebagai mediator pada fungsi spermatozoa normal dan terlibat dalam

hiperaktivasi, kapasitas, reaksi akrosom dan fusi spermatozoa dengan sel telur (Griveau *et al.*, 1995; Zini *et al.*, 1995 dan de Lamirande *et al.*, 1997), namun kenaikan produksi ROS di atas level normal dapat menyebabkan peroksidasi lipid (Alvarez *et al.*, 1987), inaktivasi enzim-enzim glikolitik dan kerusakan pada membran akrosom (Alvarez and Storey, 1989) serta pemutusan rantai DNA spermatozoa yang selanjutnya menyebabkan hilangnya motilitas spermatozoa (Fraga *et al.*, 1991; Aitken, 1995; Donnelly *et al.*, 1999; Sikka *et al.*, 2001; Guzman *et al.*, 2001 dan Sudjarwo, 2001). Hal ini terjadi dalam suatu keadaan yang disebut stress oksidatif, di mana produksi ROS sangat meningkat melebihi kemampuan antioksidan untuk menetralsirnya. Dalam keadaan aktivitas fisik dan trauma fisik yang berat pada sel, produksi ROS dapat menjadi sangat meningkat, karena ambilan oksigen dan kegiatan metabolisme makin meningkat (Halliwell and Gutteridge, 1999). Aktivitas metabolisme dan produksi ROS pada spermatozoa manusia yang mengalami trauma fisik yang berat akibat pembilasan secara berulang-ulang dengan sentrifugasi dapat meningkat beberapa kali diatas spermatozoa basal (Aitken *et al.*, 1992; Shakarriz *et al.*, 1995 dan Agarwal *et al.*, 2003).

Lipid merupakan komponen membran yang sangat penting dalam menjaga stabilitas membran dan kelangsungan hidup spermatozoa secara keseluruhan termasuk kapasitas, reaksi akrosom dan fusi spermatozoa dengan sel telur. Sebagian besar lipid membran spermatozoa mammalia mengandung asam lemak poli tak jenuh (*poly unsaturated fatty acid (PUFA)*) dalam konsentrasi yang tinggi (Alvarez and Storey, 1995). Asam

lemak poli tak jenuh terikat membran selain penting untuk meregulasi fluiditas membran, juga merupakan substrat utama dari peroksidasi lipid (Aitken *et al.*, 1995; Kelso *et al.*, 1997; Dorota and Kurpizs, 2004). Telah terbukti bahwa bila asam lemak poli tak jenuh bereaksi dengan radikal hidroksil (salah satu bentuk ROS), maka akan terjadi reaksi berantai yang dikenal sebagai peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi berantai ini adalah terputusnya rantai asam-asam lemak menjadi berbagai senyawa aldehid seperti *malondialdehyde (MDA)*, 9-hidroksi nonenal, bermacam-macam hidrokarbon dan etana yang dapat merusak membran sel (Halliwell and Gutteridge, 1999 dan Suryohudoyo, 2000). Rusaknya membran sel akan meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga bahan-bahan yang semestinya tidak boleh melewati membran sel dapat secara bebas keluar-masuk sel dan akhirnya integritas sel spermatozoa terganggu. Bukti-bukti terjadinya kerusakan integritas membran spermatozoa yang berhubungan dengan aktivitas ROS yang terbentuk secara *in vitro* telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti (Alvarez and Storey, 1995; de lamirande *et al.*, 1997; Agarwall *et al.*, 2003; Dorota and Kurpizs, 2004)

Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selain dapat menyebabkan kerusakan integritas membran, juga dilaporkan dapat menginduksi pembentukan ROS dan perubahan profil lipid membran spermatozoa. Ditemukan adanya peningkatan akumulasi produksi ROS spermatozoa manusia yang bermakna setelah pemisahan dengan sentrifugasi sentrifugasi gradien densitas percoll (Iwazaki and Gagnon, 1992; Agarwal *et al.*, 1994; Shakamiz *et al.*, 1995 dan Ding *et al.*,

1999) Sedangkan Guzman *et al.* (2001) menemukan penurunan yang sangat bermakna kandungan fosfolipid, kolesterol dan DHA membran spermatozoa manusia setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll. Besarnya tingkat akumulasi produksi ROS dan penurunan profil lipid membran spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll sangat tergantung pada lama dan kecepatan sentrifugasi serta jenis spermatozoa yang digunakan. Oleh karena itu kajian tentang penetapan lama sentrifugasi gradien densitas percoll yang mempertimbangkan tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa pada individu tertentu merupakan suatu hal yang penting. Lama sentrifugasi harus ditetapkan secara tepat pada setiap individu berdasarkan prinsip dasar pemisahan, agar tujuan preseleksi jenis kelamin anak dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat tercapai tanpa menyebabkan penurunan kualitas fungsional spermatozoa.

Kajian tentang penetapan lama sentrifugasi gradien densitas percoll, khususnya sebagai metode preseleksi jenis kelamin anak selama ini masih banyak berorientasi pada indikator biologik yang berkaitan dengan kinerja fisik saja seperti peningkatan rasio jenis kelamin anak yang dilahirkan, kemampuan motilitas, viabilitas, integritas membran dan fertilitas spermatozoa (Safei, 1990, Watskin *et al.*, 1996 dan Susilawati, 2000). Agar keberhasilan preseleksi jenis kelamin dengan sentrifugasi gradien densitas percoll mendapat proporsi yang sama dengan tingkat fertilitas spermatozoa, hendaknya indikator-indikator biologik lainnya sudah perlu dipertimbangkan misalnya indikator-indikator yang dapat

menunjukkan tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa yang berkaitan dengan aktivitas ROS dan perubahan profil lipid membran spermatozoa, khususnya pada spermatozoa kerbau lumpur yang informasi ilmiahnya masih sangat terbatas.

1. 2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pemikiran yang telah dikemukakan pada latar belakang masalah, maka dapat dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut;

1. Apakah pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll berpengaruh terhadap tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan profil lipid membran dan kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur ?
2. Apakah ada perbedaan tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan profil lipid membran dan kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit ?
3. Apakah peningkatan akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid dan penurunan profil lipid membran terhadap tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll ?

4. Bagaimanakah jalur mekanisme peran akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid dan penurunan profil lipid membran dengan tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll ?

1. 3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengungkapkan pengaruh pemisahan spermatozoa sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap akumulasi produksi ROS dan perannya dalam mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur.

1. 3. 2. Tujuan Khusus

1. Untuk menjelaskan pengaruh pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan profil lipid membran dan kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur
2. Untuk menguji ada tidaknya perbedaan tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid dan profil asam lemak membran dan kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit

3. Untuk menjelaskan pengaruh peningkatan akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid dan penurunan profil lipid membran terhadap tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.
4. Untuk menerangkan jalur mekanisme peran akumulasi produksi ROS, tingkat peroksidasi lipid dan penurunan profil lipid membran dengan tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.

1. 4. Manfaat Penelitian

1. 4. 1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian diharapkan dapat menghasilkan beberapa informasi ilmiah, khususnya :

1. Rumusan konsep tentang mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa khususnya kerbau lumpur akibat pemisahan dengan sentrifugasi gradien percoll melalui peningkatan akumulasi produksi senyawa oksigen reaktif (ROS)
2. Rumusan konsep tentang mekanisme peningkatan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa akibat pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll

1. 4. 2. Manfaat Praktis

Bila dapat mengungkapkan mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien percoll akibat peningkatan akumulasi dan aktivitas ROS maka;

1. Diharapkan dapat dikembangkan penelitian lebih lanjut dalam rangka mengantisipasi akibat buruk yang dapat terjadi pada pemanfaatan sentrifugasi gradien densitas percoll pada pre seleksi jenis kelamin melalui penambahan antioksidan.
2. Diharapkan dapat memberi petunjuk yang bermanfaat untuk menetapkan lama waktu sentrifugasi yang tepat dalam pelaksanaan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.
3. Diharapkan dapat memberi sumbangan terhadap pengembangan IPTEK khususnya bioteknologi reproduksi preseleksi jenis kelamin anak dan pemanfaatannya dalam meningkatkan populasi ternak melalui IB pada ternak kerbau lumpur khususnya dan hewan lain pada umumnya.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1. Tinjauan Umum Reproduksi Kerbau lumpur

Ternak kerbau (*Bubalus bubalis*) diklasifikasikan dalam kingdom *animals*, klas *mammalia*, subklas *ungulata*, ordo *artiodactyla*, sub ordo *ruminansia*, famili *bovidae*, genus *bubalus* dan spesies *bubalis*. Menurut domestikasinya, ternak kerbau dibagi menjadi dua tipe yaitu kerbau sungai (*river buffalo*) dan kerbau lumpur (*swamp buffalo*). Kedua tipe ini berbeda dalam komformasi tubuh, kebiasaan berkubang, jumlah kromosom dan pemanfaatannya. Kerbau sungai (*river buffalo*) dikenal dengan kerbau murreh merupakan jenis kerbau yang senang berenang atau berendam di air sungai. Kerbau murreh selain digunakan sebagai tenaga kerja dan penghasil daging, juga sebagai penghasil susu yang berkadar lemak dan laktosa tinggi. Sedangkan kerbau lumpur (*swamp buffalo*) dikenal dengan nama kerbau kubangan atau kerbau sawah, merupakan kerbau lokal dengan bobot badan yang sangat beraneka ragam dan senang berkubang dilumpur. Kerbau lumpur mempunyai ciri bentuk tubuh yang agak bundar dengan rangka tubuh yang pendek, tanduk lebar, melengkung dan sedikit bervariasi serta temperamen tidak tenang. Kerbau lumpur umumnya tidak tahan panas, oleh sebab itu efisiensi kerjanya menurun pada saat teriknya sinar matahari serta kurang cepat dalam pekerjaan tetapi tahan terhadap kerja yang berat. Kerbau lumpur selain digunakan sebagai tenaga kerja dan penghasil daging,

kadang-kadang juga berperan dalam adat istiadat dan kepercayaan berbagai suku bangsa (Batossama, 1985).

Kerbau lumpur jantan di Indonesia mencapai dewasa kelamin pada umur 24 – 30 bulan atau rata-rata 26,7 bulan dengan berat badan berkisar antara 300 – 400 kg, meskipun pada umur sebelumnya ia sudah mulai mencoba menaiki kerbau betina, tetapi perkawinan yang berhasil terjadi setelah kerbau jantan mencapai umur 3,7 tahun atau lebih (Toelihere, 1985). Pada saat kawin, waktu antara pendekatan pejantan terhadap hewan betina sampai terjadinya ejakulasi berkisar antara 1,5 sampai 4 menit dengan rata-rata 2,3 menit. Kerbau lumpur jantan sehat mampu mengawini betina dengan angka kebuntingan yang tetap tinggi sampai berumur 10 tahun atau lebih. Namun mulai ada penurunan kemampuan mengawini setelah kerbau berumur lebih dari 12 tahun. Kerbau lumpur jantan yang sehat sanggup mengawini betina 100 ekor betina dalam setahun atau tiga ekor dalam seminggu (Toelihere, 1985).

2. 2. Karakteristik Semen Kerbau lumpur

Semen merupakan suatu suspensi selluler semigelatin yang mengandung gamet jantan (spermatozoa) dan sekresi yang berasal dari kelenjer pelengkap organ reproduksi jantan. Bagian cair dari suspensi ini yang terbentuk pada saat ejakulasi disebut plasma seminalis (Hafez, 2000).

Semen kerbau lumpur yang sehat berwarna putih kekuning-kuningan atau putih susu dengan konsistensi encer sampai kental. Warna

dan konsistensi ini tergantung pada konsentrasi spermatozoa yang dikandungnya. Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa tinggi mempunyai konsistensi kental dengan warna putih kekuning-kuningan, sedangkan semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa rendah berkonsistensi encer dengan warna agak pucat (Situmorang, 1995).

Volume semen kerbau lumpur dewasa satu kali ejakulasi umumnya lebih rendah dibandingkan dengan sapi. Rata-rata volume ejakulat kerbau lumpur di Indonesia berkisar antara 1,5 – 3,0 ml (Toelihere, 1985), 1,0 – 3,5 ml (Amin, 1998) dan 1,5 - 3,7 ml (Sumarmo, 1998). Volume semen kerbau lumpur ini bervariasi menurut individu dan tidak ada perbedaan antara dua penampungan berturut-turut, tetapi dari empat kali penampungan berturut-turut, volume semen mulai menurun pada ejakulat ketiga dan ke empat (Anzar *et al.*, 1997).

Gerakan massa spermatozoa merupakan cerminan dari motilitas dan gerakan individu spermatozoa. Berdasarkan penilaian gerakan massa, kualitas semen dikelompokan sebagai berikut (a) sangat baik (+++), terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif; (b) baik (++), bila terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang dan gerakan lamban; (c) cukup (+) jika tidak terlihat gelombang, melainkan hanya gerakan-gerakan individu dan (d) jelek (0), bila hanya sedikit atau tidak ada gerakan-gerakan individual. Gerakan massa spermatozoa kerbau lumpur di Indonesia berkisar antara 1 (+) sampai 3 (+++) (Amin, 1998).

Konsentrasi spermatozoa pada kerbau lumpur relatif lebih rendah daripada sapi. Konsentrasi spermatozoa kerbau lumpur di Indonesia berkisar antara 200 – 1000 juta / ml dengan rata-rata 600 juta/ml (Toelihere, 1985). Sedangkan pada kerbau belang konsentrasi spermatozoa berkisar antara 600 – 1000 juta/ml dengan rata-rata 800 juta/ml (Batossama, 1985).

Motilitas spermatozoa kerbau lumpur dalam semen segar yang baru ditampung relatif lebih rendah daripada spermatozoa kerbau murreh, tetapi jumlah spermatozoa motil relatif sama. Menurut Toelihere (1985) persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur di Indonesia berkisar antara 70 - 80 % atau rata-rata $75,00 \pm 3,16\%$, dengan persentase hidup spermatozoa berkisar antara 48 - 80% atau rata-rata 66,67 % dan persentase abnormalitas antara 10 % sampai 20 % atau rata-rata 12 %.

Derajat keasaman (pH) semen kerbau lumpur relatif agak asam yaitu berkisar antara 6,4 sampai 7,6 atau rata-rata 6,8 (Toelihere, 1985). Derajat keasaman sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari pH normal akan membuat spermatozoa lebih cepat mati.

2.2.1. Plasma seminalis Kerbau Lumpur

Plasma seminalis merupakan cairan yang disekresikan terutama oleh kelenjer vesikularis dan kelenjer aksesoris lainnya. Plasma seminalis berfungsi sebagai medium transport spermatozoa dari lingkungan saluran reproduksi jantan ke traktus reproduksi betina selama ejakulasi, sebagai

medium aktivasi bagi spermatozoa non motil dan menyediakan penyangga serta kaya akan makanan yang penting untuk hidup spermatozoa setelah deposisi ke traktus reproduksi betina. Plasma seminalis sebagian besar terdiri dari air (sekitar 75 %), merupakan cairan netral dengan tekanan isotonik serta berisi substansi organik dan anorganik sebagai cadangan makanan dan perlindungan spermatozoa. Cairan isotonik plasma seminalis terutama dipertahankan oleh substansi organik (fruktosa, sarbitol, inositol, asam sitrat, gliserilfosforilkolin, fosfolipid, prostaglandin dan protein). Kumar *et al.* (1991) menyatakan bahwa sifat-sifat biokimia plasma seminalis semen kerbau lumpur berbeda dengan plasma seminalis semen sapi. Plasma seminalis semen kerbau lumpur mengandung elektrolit-elektrolit seperti natrium, klorida, fosfor, bikarbonat, kalsium dan fosfor larut dalam asam yang lebih tinggi dibandingkan dengan plasma seminalis semen sapi, sebaliknya kandungan asam sitrat, asam askorbat, fruktosa, magnesium, nitrogen, kolesterol dan indeksprotolisis lebih rendah. Kandungan protein plasma seminalis semen kerbau lumpur nyata lebih rendah dibandingkan dengan plasma seminalis semen sapi, akan tetapi kandungan nitrogen non protein semen kerbau lumpur 2 kali lebih tinggi dibandingkan dengan sapi. Perbandingan bahan organik dan anorganik dalam plasma seminalis semen kerbau lumpur dengan sapi tertera pada tabel 1.

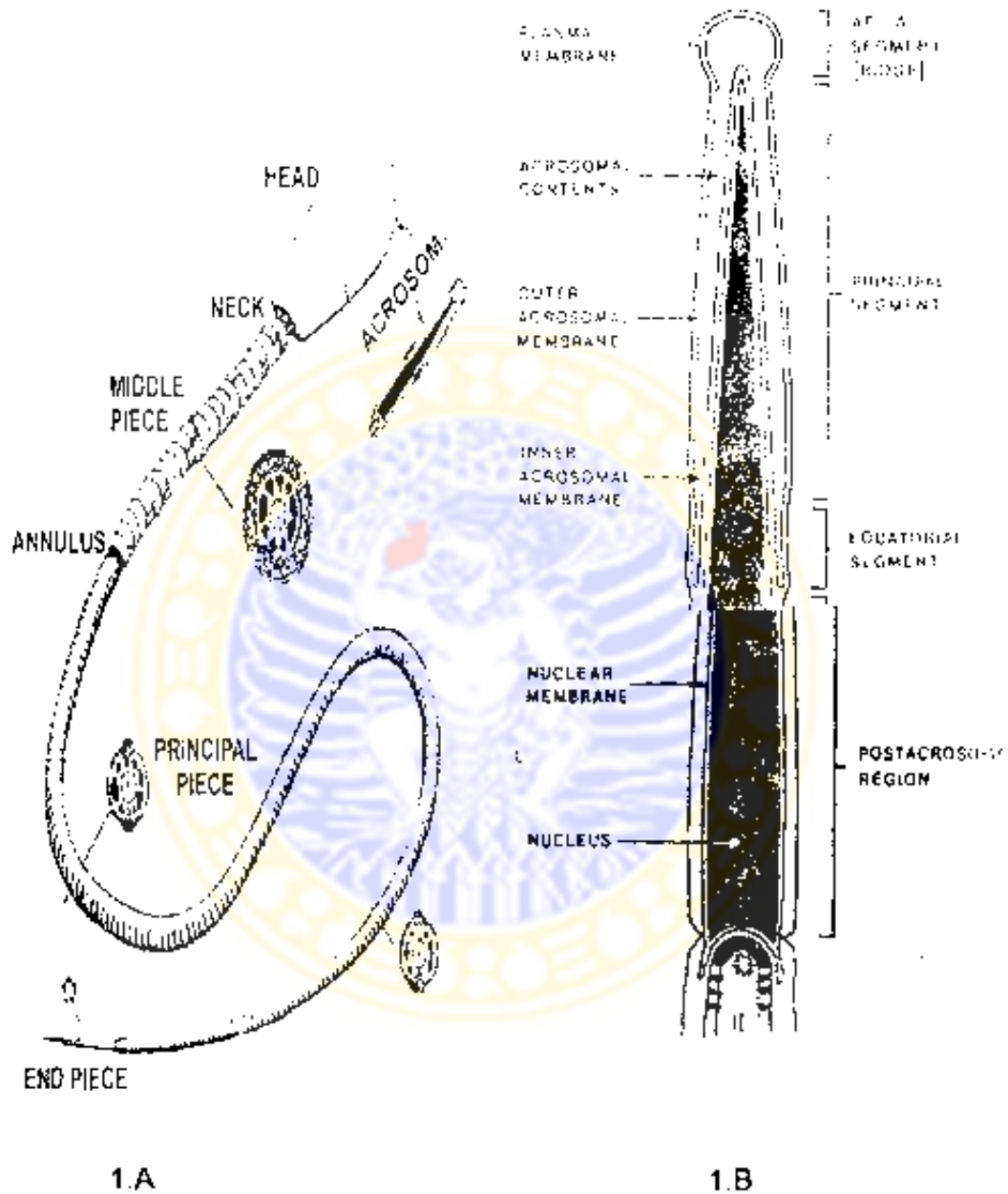
Tabel 1: Perbandingan bahan organik dan anorganik semen kerbau lumpur dengan sapi Frisian Holstein

No	Komposisi	Kerbau lumpur -----mg/100 ml-----	Sapi FH -----mg/100 ml-----
1	Klorida	373,00	248,00
2	Kalium	60,10	48,30
3	Kalsium	39,30	25,60
4	Natrium	150,20	217,37
5	Asam sitrat	489,00	720,00
6	Asam askorbat	10,70	14,29
7	Protein	314,40	694,60
8	Fruktosa	782,49	952,71
9	Kolesterol	48,98	63,52
10	Total Fosfor	103,00	47,00

Sumber: Kumar *et al.* (1991)

2. 2. 2. Spermatozoa Kerbau Lumpur

Spermatozoa merupakan sel eukariot yang kompak dan sangat khas, serta tidak mengalami pertumbuhan lagi. Spermatozoa berasal dari pembelahan genosit menjadi spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, berkembang menjadi spermatid I selanjutnya menjadi spermatozoa melalui proses yang disebut spermatogenesis. Secara esensial struktur morfologis spermatozoa mamalia relatif sama, tetapi bentuk dan ukurannya berbeda-beda antar spesies. Panjang keseluruhan spermatozoa kerbau lumpur berkisar antara 70 - 72 μm yang terdiri dari kepala, leher dan ekor yang keseluruhannya diselaputi oleh membran plasma (Gambar 1).



Gambar 1. A. Struktur morfologi Spermatozoa Mammalia secara utuh

Gambar 1. B. Pemotongan sagital kepala spermatozoa mammalia dengan berbagai bagian anatomisnya

(Sumber : Hafez, 1993)

2.2.2.1. Kepala

Secara morfologis kepala spermatozoa kerbau lumpur relatif agak kecil dari spermatozoa sapi. Toelihere (1985) melaporkan kepala spermatozoa kerbau lumpur pada umumnya berbentuk pipih dan lonjong dengan ujung depannya lebih lebar, karena diameternya lebih besar daripada bagian kepala sebelah belakang. Panjang kepala spermatozoa kerbau lumpur berkisar antara $7,40 - 9,45 \mu\text{m}$, dengan lebar antara $4,82 - 5,08 \mu\text{m}$ dan tebal antara $1,5 - 2,0 \mu\text{m}$. Kepala spermatozoa sebagian besar terisi padat dengan materi inti, kromatin yang terdiri atas DNA yang berfungsi sebagai pembawa informasi genetik termasuk penentuan jenis kelamin embrio. Hardjopranojoto (1983) melaporkan bagian anterior kepala spermatozoa kerbau lumpur dibungkus oleh tiga lapisan pembungkus yaitu membran plasma merupakan lapisan paling luar, akrosom merupakan lapisan kedua dan selaput inti merupakan lapisan yang paling dalam. Membran plasma berfungsi untuk menjaga integritas sel dan berperan penting untuk pengenalan dan pengikatan zona pellusida dengan *outer acrosomal* membran pada saat eksositosis dan reaksi akrosom. Akrosom merupakan selubung yang berbentuk topi yang menutupi dua per tiga bagian anterior kepala dan mengandung beberapa enzim proteolitik seperti *proakrosin*, *hyaluronidase*, *protease* dan *corona penetrating enzyme* (CPE) yang penting dalam proses pembuahan. Bahan kandungan akrosom adalah setengah padat yang dikelilingi oleh dua lapis membran akrosom luar dan membran akrosom dalam yang

secara molekuler susunannya berbeda. Membran akrosom bagian luar bersatu dengan membran plasma pada saat reaksi akrosom, sedangkan membran akrosom bagian dalam menghilang. Selubung paling dalam dari kepala bagian anterior adalah selaput inti berfungsi menyelaputi inti atau DNA. Sedangkan kepala bagian posterior dibungkus oleh dua lapis pembungkus yaitu membran plasma disebelah luar dan selaput inti sebelah dalam yang disebut selubung inti posterior (*post nuclear cap*).

2.2.2.2. Leher

Leher merupakan bagian sempit yang menghubungkan kepala dengan ekor spermatozoa. Hardjopranojoto (1983) melaporkan panjang leher spermatozoa kerbau lumpur berkisar antara 4 - 7 μm . Bagian ini ditandai oleh adanya kapitulum merupakan suatu struktur bersekat padat yang berbentuk kubah dan kolom yang bersegmen. Kepala dan ekor spermatozoa dihubungkan oleh serangkaian serabut aksial atau filamen berprotein diantara kapitulum dan plat basal yang terletak dipermukaan kaudal nukleus. Pada spermatozoa kerbau lumpur hubungan bagian kepala dengan ekor kelihatan agak renggang dan kurang erat dibandingkan dengan spermatozoa sapi, sehingga spermatozoa kerbau lumpur lebih mudah rusak bila dibekukan (Singh *et al.*, 1995; Goyal *et al.*, 1997 dan Rasul *et al.*, 2001)

2.2.2.3. Ekor

Ekor merupakan bagian terpanjang dari spermatozoa, berfungsi untuk produksi energi, pergerakan dan pengendalian arah spermatozoa pada saat fertilisasi. Toelihere (1985) menyatakan rata-rata panjang ekor spermatozoa kerbau lumpur adalah $60,56 \pm 5,82 \mu\text{m}$ yang terbagi dari *middle piece* (ekor bagian tengah), *principle piece* (ekor bagian utama), dan *end piece* (ekor bagian ujung). Masing-masing daerah memiliki anatomi yang berbeda sesuai dengan fungsinya masing-masing. Kesemua bagian ekor spermatozoa ini mengandung axonema yang terdiri dari sembilan pasang mikrotubulus tersusun secara radial mengelilingi dua filamen. Aksonem ini merupakan alat penggerak dari ekor spermatozoa (Hafez, 1993).

Middle piece atau bagian tengah merupakan bagian ekor yang paling dekat dengan kepala dengan panjangnya berkisar $5 - 7 \mu\text{m}$ dengan diameter $0,5 - 1,0 \mu\text{m}$, merentang dari ujung distal bagian *connecting piece* ke annulus. Ciri utama dari bagian tengah adalah adanya selaput mitokondria (*mitochondrial sheath*) yang terdiri dari beberapa mitokondria, terletak dari ujung ke ujung dan tersusun secara heliks di sekitar aksonema. Hardjopranjoto (1983) melaporkan bahwa *mitochondrial sheath* pada spermatozoa kerbau lumpur, terlihat kurang teratur dibanding dengan spesies mamalia lainnya. Thatham (2000) menyatakan struktur internal mitokondria spermatozoa sama dengan yang terlihat pada jenis sel lainnya, akan tetapi membran bagian luarnya

memiliki stabilitas yang tinggi. Hal ini dibuktikan oleh resistensi mitokondria terhadap perubahan-perubahan osmotik. Mitokondria berfungsi untuk menghasilkan energi dalam bentuk ATP yang dibutuhkan bagi kehidupan sel, melalui proses fosforilasi oksidatif karbohidrat, protein dan lemak yang disandi oleh sub unit-sub unit yang terdapat pada membran mitokondria (Curry and Watson, 1995). Membran luar mitokondria mengandung NADH-sitokrom reduktase, monoamin oksidase, asil- koA sintetase bergantung ATP dan enzim yang penting untuk metabolisme fosfolipid. Ruang inter membran berisi fosfotransferase, adenilat-kinase, nukleosida fosfokinase dan keratin kinase, membran dalam berisi rangkaian sitokrom, dehidrogenase untuk NADH, enzim fosforilase yang penting untuk memetabolisme asam lemak. Bagian *middle piece* juga mengandung sentriol proksimal dengan pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak (Hafez, 2000).

Principal Piece (bagian utama), merupakan segmen flagel terpanjang sekitar 45 - 50 μm yang merentang dari anulus ke ujung proksimal bagian terminal (*terminal piece*). Bagian utama ini dicirikan oleh adanya *fibrous sheath*, yaitu struktur sitoskeletal yang mengelilingi aksonema dan *outer dense fibres*. *Fibrous sheath* tersebut terdiri dari dua kolom longitudinal perifer. yang terletak di bidang pasangan mikrotubula tengah, yang dihubungkan bersama mengelilingi bundaran ekor dengan sejumlah *ribs* yang tersusun dari filamen-filamen yang terbungkus erat.

Hardjopranjoto (1983) menyatakan, bagian ini mengandung aksonema dan 20 serabut aksial yang terdiri dari susunan 9 pasang serabut aksial yang kasar sebelah luar yang tersusun secara radial, 9 serabut aksial yang lebih kecil sebelah dalam mengelilingi dua filamen tengah sehingga membentuk pola "9+9+2". Kolom-kolom longitudinal bertumpuk dan bersatu dengan dua *outer dense fibres* pendek, dan melekat pada doublet mikrotubula pokoknya. Fungsi *fibrous sheath* sama dengan *outer dense fibres* yaitu sebagai "korset" elastis mengontrol gerakan flagel.

End piece merupakan bagian ujung dari ekor spermatozoa dengan panjang sekitar 5 μm . Unsur-unsur mikrotubula aksonema berakhir di daerah ini. Meskipun bagian ini tidak mempunyai fibril, tetapi *end piece*, mengandung enzim dan bahan lipid yang berfungsi mengkoordinir kontraksi dan serabut aksial untuk memberi gerak maju kepada spermatozoa (Hardjopranjoto, 1985 dan Hafez, 2000).

2.2.3. Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur

Spermatozoa dari kepala sampai ekor diselaputi oleh membran sel, dengan struktur yang sangat kompleks dalam susunan mosaik yang teratur dan memiliki peran biologik spesifik pada permukaannya. Damel *et al.* (1990) melaporkan hampir semua membran mengandung enzim dan sistem transport yang membantu mempertahankan kesetimbangan intraselluler. Disamping itu membran juga mengandung gugus-gugus permukaan yang bermuatan listrik untuk mempertahankan perbedaan potensial listrik sepanjang struktur membran. Bagian luar membran

banyak mengandung sisi pengenalan spesifik untuk mengenali isyarat molekuler tertentu yang memungkinkan komunikasi antar sel (Yeagle, 1994).

Berbeda dengan banyak tipe sel lainnya, permukaan membran spermatozoa mempunyai polaritas yang tinggi dengan struktur daerah yang secara geografis jelas pembagiannya. Curry and Watson (1995) melaporkan bahwa permukaan membran spermatozoa memiliki lima daerah membran utama, yang masing-masing berhubungan erat dengan kompartemen sel pokok dan terlibat dengan aspek-aspek fungsi sel yang berbeda. Bagian kepala memiliki tiga daerah utama yaitu membran akrosom, daerah ekuatorial dan daerah bagian belakang akrosom (*post acrosomal region*). Membran akrosom kepala berfungsi untuk kapasitas, reaksi akrosom dan penembusan ovum pada proses fertilisasi. Membran daerah ekuatorial dan bagian belakang akrosom berfungsi untuk mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema ovum pada proses fertilisasi. Sedangkan bagian ekor memiliki daerah yang berbeda di bagian tengah dan bagian utama. Membran pada bagian tengah ekor berfungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi spermatozoa dan menghantarkan gelombang gerak, serta membran bagian utama berfungsi untuk pergerakan spermatozoa.

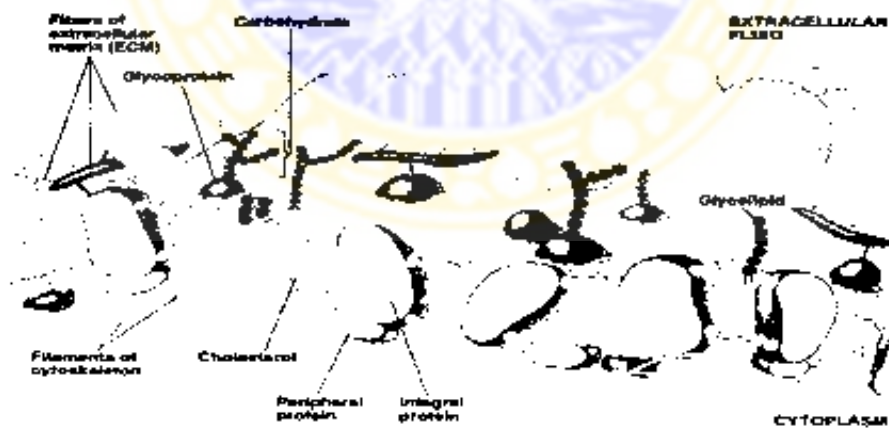
Secara umum struktur membran spermatozoa tersusun dari 43 % lipid, 48 % protein, 9 % karbohidrat dan zat-zat lain yang bergabung bersama secara non kovalen, dan sangat sensitif terhadap faktor-faktor

ekstrinsik seperti suhu, kekuatan ionik dan polaritas pelarut (Park and Graham, 1992). Lipid merupakan komponen membran spermatozoa, yang berperan penting dalam menjaga stabilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa secara keseluruhan, termasuk kemampuan spermatozoa untuk mengkapasitasi serta membuahi sel telur. Dilaporkan oleh beberapa peneliti terdahulu lipid membran spermatozoa tersusun dari fosfolipid, kolesterol, triasilgliserol dan asam lemak bebas (Kelso *et al.*, 1997; Dorota and Kurpisz, 2004).

2.2.3.1. Fosfolipid

Fosfolipid merupakan komponen utama lipid membran spermatozoa, yang membentuk membran lapis ganda kepala fosfolipid hidrofilik dan fosfolipid hidropobik yang sangat penting kaitannya dengan proses fertilisasi dan mempertahankan ketidastabilannya selama pembekuan adalah fosfolipid dan kolesterol. Kepala fosfolipid hidrofilik membentuk permukaan membran bagian luar sedangkan kepala hidropobik membentuk permukaan membran bagian dalam (Darnel *et al.*, 1990). Diantara lapisan kepala fosfolipid hidrofilik dan kepala fosfolipid hidropobik terdapat protein globular dan fibrous dengan distribusi yang bervariasi. Protein-protein ini bersifat dinamis dan dapat bergerak bebas di antara kedua lapisan fosfolipid. Protein-protein pada membran ini ada yang terletak secara vertikal sehingga sebagian masuk dan menembus ke dalam dua lapisan fosfolipid (*lipid bilayer*) serta berinteraksi dengan bagian hidropilik dari lipid membran yang disebut protein integral,

sedangkan protein-protein yang terletak dipermukaan bagian luar membran sebagai pemegang dua lapisan fosfolipid disebut protein ferifer. Protein-protein ini berfungsi sebagai reseptor terhadap rangsangan eksternal dan sinyal (misalnya cahaya, aroma, hormon, obat-obatan, faktor penumbuh dan transporter), sebagai enzim dan antigen yang terlibat dalam pengenalan kepala spermatozoa (misalnya adesi zonapelusida-spermatozoa, induksi reaksi akrosom dan fusi spermatozoa-sel telur). Pada bagian luar dari kedua lapisan fosfolipid terdapat karbohidrat yang sebagian besar berbentuk glikokaliks, merupakan oligosakarida yang berikatan dengan protein dan membran lipid. Karbohidrat membran spermatozoa selain berfungsi sebagai sumber untuk pembentukan ATP, juga berperan penting dalam membantu proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Herrero *et al.*, 1999).



Gambar 2. 2. Struktur molekuler fosfolipid lapis ganda dari membran sel
Sumber : Voet and 1997

Alvarez and Storey (1995) melaporkan bahwa sebagian besar fosfolipid membran spermatozoa mammalia, mengandung asam lemak

poli tak jenuh (*poli unsaturated fatty acide*) dalam konsentrasi yang sangat tinggi. Asam-asam lemak poli tak jenuh ini penting untuk mempertahankan fluiditas (sifat kecairan) membran plasma yang dibutuhkan untuk memelihara fungsi-fungsi biokimia dan biologis penting, termasuk pemeliharaan berbagai aktivitas enzim terikat membran dan penyempurnaan peristiwa fusi membran yang terkait dengan reaksi akrosom dan penyatuan spermatozoa dengan sel telur (Dorota and Kurpisz, 2004). *Docosahexanoic acide* (DHA) merupakan asam lemak poli tak jenuh terpenting pada membran spermatozoa, mewakili 30 % total asam lemak dan 73 % asam lemak poli tak jenuh terikat fosfolipid, yang sebagian besarnya terdapat pada fraksi fosfatidil etanolamin dan fraksi fosfatidil kolin (Kelso *et al.*, 1997). Khusus pada spermatozoa kerbau kandungan DHA pada membran spermatozoa berkisar antara 60 – 70 % dari total asam lemak membran spermatozoa (Anand and Jain, 1976). DHA selain penting dalam meregulasi fluiditas membran yang dibutuhkan untuk memelihara berbagai aktivitas enzim dan penyempurnaan peristiwa fusi membran dengan sel telur, juga merupakan substrat utama dari peroksidasi lipid. Hampir 90% dari tingkat peroksidasi lipid pada membran spermatozoa dipengaruhi oleh tingginya konsentrasi DHA terikat fosfolipid (Alvarez and Storey, 1984). Oksidasi DHA terikat fosfolipid juga ditunjukkan sebagai faktor utama yang menentukan lama hidup spermatozoa motif *in vitro* (Alvarez and Storey, 1984), merosotnya akrosom dan oksidasi DNA spermatozoa (Fraga *et al.*, 1996).

2.2.3.2. Kolesterol

Kolesterol merupakan komponen lipid membran yang mempunyai satu gugus hidroksil dan satu ikatan rangkap pada cincin steroid dengan delapan rantai atom karbon (Meyes *et al.*, 1993). Kolesterol sangat vital bagi spermatozoa dalam mempertahankan fluiditas (sifat kecairan) membran. Semakin banyak kandungan kolesterol pada membran akan membuat membran semakin bersifat cair, sebaliknya semakin sedikit kandungan kolesterol pada membran akan menyebabkan spermatozoa semakin mudah mengalami kerusakan (Parks and Graham, 1992; Kelso *et al.*, 1997; Dorota and kurpiz, 2004). Terbukti ada korelasi yang kuat antara kandungan kolesterol membran dengan tingkat keutuhan membran spermatozoa (Park and Graham, 1992; Sinha *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1995 dan Cross, 1996).

Spermatozoa mamalia yang baru diejakulasikan umumnya memiliki kandungan kolesterol dalam konsentrasi tinggi, yang terdistribusi pada membran akrosom dan membran plasma flagella. Kandungan kolesterol pada membran akrosom lebih rendah dari pada membran plasma bagian ekor spermatozoa (Park and Graham, 1992). Rasio kolesterol dan fosfolipid (C/PL) membran spermatozoa berbeda-beda antar spesies. Pada spermatozoa kerbau rasio kolesterol dan fosfolipid membran berkisar sekitar 0,25 - 0,34 (Anand and Jain, 1976), lebih rendah dari spermatozoa manusia 0,83 (Mack *et al.*, 1985), spermatozoa biri-biri 0,43 (Parks and Hammerstedt, 1985), spermatozoa kuda sekitar 0,36

(Parks *et al.*, 1992) maupun spermatozoa sapi 0,40 (Kelso *et al.*, 1997). Hal inilah yang menyebabkan spermatozoa kerbau lumpur lebih mudah mengalami kerusakan bila dibekukan (Shinha *et al.*, 1996).

Kolesterol membran selain penting dalam mempertahankan fluiditas membran spermatozoa juga dilaporkan berperan penting dalam proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa. Cross (1998) melaporkan selama proses kapasitasi terjadi pengurangan rasio kolesterol dengan fosfolipid pada membran plasma spermatozoa. Pengurangan kolesterol selama proses kapasitasi ini penting untuk membentuk bidang (*patches*) bebas-kolesterol dan bidang-bidang ini menjadi tempat fusi pada waktu reaksi akrosom. Disamping itu, pengurangan kolesterol ini juga akan memungkinkan gerakan lateral protein-protein membran integral secara leluasa dan permeabilitas yang lebih besar terhadap masuknya ion Ca^{2+} ekstraselluler dalam sel untuk memicu terjadinya reaksi akrosom (Visconti and Koff, 1999 dan Cross, 2000).

2. 3. Pemisahan Spermatozoa X dan Y

Sejalan dengan manfaat teknologi inseminasi buatan (IB) pada ternak tentang penghematan biaya dan tenaga pemeliharaan pejantan, praktis pengaturan perkembangbiakan dengan maksud untuk menentukan jenis kelamin anak sesuai tujuan peternakan akan lebih menguntungkan. Maksud tersebut dapat dicapai dengan jalan memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dengan spermatozoa berkromosom seks Y, lalu menginseminasikannya ke dalam saluran reproduksi induk betina (Sukra

dkk., 1992). Dalam bidang peternakan seleksi jenis kelamin anak sangat menguntungkan untuk dikembangkan karena selain dapat mengurangi biaya pemeliharaan juga dapat menghasilkan pedet jantan atau betina superior sebagai induk menghasilkan daging atau susu (Hafez, 1993).

Semua sel dalam tubuh adalah sel somatik, kecuali sel-sel kelamin yaitu spermatozoa dan ovum. Sel kelamin yang masih muda mempunyai susunan kromosom yang sama dengan sel somatik misalnya pada manusia adalah 46, kemudian mengalami reduksi menjadi separuhnya pada waktu proses spermatogenesis atau oogenesis. Dengan demikian pada spermatozoa hanya terdapat 23 kromosom yang terdiri dari 22 autosom dan satu kromosom seks X dan Y (Hafez, 1993).

Pada mammalia, kromosom seks yang dikandung spermatozoa bertanggung jawab terhadap penentuan jenis kelamin anak yang dilahirkan. Spermatozoa yang berkromosom Y (spermatozoa Y) berhasil membuahi sel telur, maka akan dilahirkan anak berjenis kelamin jantan (XY). Hal ini terjadi karena spermatozoa Y mengandung gen *Testis Determining Factor (TDF)* yang mengarahkan pertumbuhan gonad primordial untuk membentuk testis. Selanjutnya, testis (sel-sel sertoli) akan mengsekresikan hormon *Anti Mullerian Duct Factor (AMDF)* yang dapat meregresi pertumbuhan saluran *Muller*, sehingga saluran reproduksi betina (oviduk, uterus, serviks dan vagina) tidak akan terbentuk (Koopman, 1995). Selain itu, testis (sel leydig) juga mensekresikan hormon testosteron yang menyebabkan maskulinisasi pada fetus dan

membantu dalam proses pembentukan penis dan skrotum serta merangsang pertumbuhan saluran Wolff untuk membentuk epididimis, vas deferens dan kelenjer vesikularis. Sebaliknya jika spermatozoa berkromosom X (spermatozoa X) berhasil membuahi sel telur, maka akan dilahirkan anak berjenis kelamin betina dengan komposisi kromosom secara normal yaitu XX. Ketidak hadirannya gen TDF akan menyebabkan gonad primordial berubah menjadi ovarium. Selanjutnya, ovarium (sel-sel granulosa dan sel theca) akan mensekresikan hormon estrogen yang akan merangsang pertumbuhan saluran Muller untuk membentuk saluran reproduksi betina (Gilbert, 1988).

Pengamatan yang lebih serius perbedaan antara spermatozoa X dan spermatozoa Y terutama pada manusia pertama-tama dilaporkan oleh Morgan pada tahun 1919 (Hafez, 1993). Spermatozoa Y memiliki kepala yang lebih kecil dan ringan dibandingkan dengan spermatozoa X. Shettles dalam Safei (1990) melaporkan spermatozoa Y memiliki ukuran kromosom 2,35 kali yang lebih kecil dibandingkan dengan spermatozoa X. Kandungan DNA pada spermatozoa Y adalah 2,75 % lebih sedikit dibandingkan dengan spermatozoa X. Tingginya kandungan kromatin dan DNA pada kepala spermatozoa X membuat ukuran dan berat kepala spermatozoa X lebih tinggi dibandingkan spermatozoa Y. Hendriksen *et al.* (1993) melaporkan permukaan membran spermatozoa Y mengandung antigen H-Y, sehingga bila dikompertisikan dengan antibodi berlabel fluorescen pada akan terlihat adanya pancaran warna biru,

sedangkan spermatozoa berkromosom X tidak memperlihatkan pancaran warna. Hafez (2000) melaporkan bahwa spermatozoa Y bergerak kearah katoda, sedangkan spermatozoa X bergerak kearah anoda.

Berdasarkan perbedaan karakteristik kedua tipe spermatozoa X dan spermatozoa Y, telah dikembangkan berbagai metode pemisahan spermatozoa diantaranya adalah (1) albumin filtrasi dan kolom sephadex (Ericson dan Glass, 1987), sentrifugasi gradien densitas percoll (Kaneko *et al.*, 1983; Safei, 1990; Susilawati dkk., 1996; Watkins *et al.*, 1996; Mirajuddin, 1997; Hossifien *et al.*, 1999 dan Kobayashi *et al.*, 2003), *Flow Cytometry* (Johnson *et al.*, 1996), *Swim up* (Mahaputra dkk., 1999), kombinasi *swim up* dan *aside migration* (Mahaputra dkk., 1999 dan Yuliani, 2000).

2. 4. Pemisahan Spermatozoa dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll.

Menurut *Pharmaceutica Fine Chemical t.t* seperti yang di kutip oleh Downson *et al.* (1996), percoll merupakan medium yang terdiri dari partikel koloid silika berdiameter antara 12 sampai 22 nm yang diselaputi dengan *polyvinylpyrolidone* (PVP); mempunyai viskositas rendah yaitu 10 ± 5 sentipois. Viskositas percoll lebih rendah dalam larutan garam dari pada dalam air maupun dalam 0,25 M sukrosa, sehingga pembentukan gradiennya lebih cepat; Percoll mempunyai pH $8,90 \pm 0,30$, tetapi mempunyai kapasitas buffer yang rendah, sehingga dengan mudah dapat disesuaikan menjadi pH 5,50 sampai 10 tanpa merubah sifat-sifatnya;

Percoll mempunyai densitas $1,13 \pm 0,005$ g/ml dan dapat membentuk gradien densitas dari 1,0 g/ml sampai dengan 1,3 g/ml.

Percoll pada awalnya digunakan untuk memisahkan sel-sel darah seperti fraksi-fraksi limfosit, monosit, eritrosit dan timosit; partikel subleuler seperti membran plasma, lysosom, peroksisom dan mitokondria, selain itu juga dapat digunakan untuk memisahkan bakteri, virus dan spermatozoa (Mc Clure *et al.*, 1989). Dalam bidang reproduksi percoll selain digunakan untuk memisahkan spermatozoa motil dengan immotil, bakteri, virus dan eritrosit dalam upaya meningkatkan keberhasilan pembuahan *in vitro* (Sakkas *et al.*, 2000 dan Ollero *et al.*, 2000), medium percoll juga dapat digunakan untuk memisahkan spermatozoa X dengan spermatozoa Y untuk tujuan preseleksi jenis kelamin anak sesuai harapan (Kaneko *et al.*, 1983; Safei, 1990; Susilawati dkk., 1996; Hossifien *et al.*, 1999 dan Kobayashi, 2003).

Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll didasarkan atas perbedaan densitas spermatozoa sebagai indikasi dari perbedaan massa dan ukuran spermatozoa X dengan spermatozoa Y. Spermatozoa X mempunyai densitas yang lebih besar daripada spermatozoa Y, sehingga bila disentrifugasi dengan gradien densitas percoll lebih cepat turun ke lapisan bawah (densitas yang lebih tinggi) dibandingkan dengan spermatozoa Y (Hafez, 1993).

Kaneko *et al.* (1983) melaporkan pemisahan spermatozoa X dan spermatozoa Y manusia dengan menggunakan sentrifugasi gradien

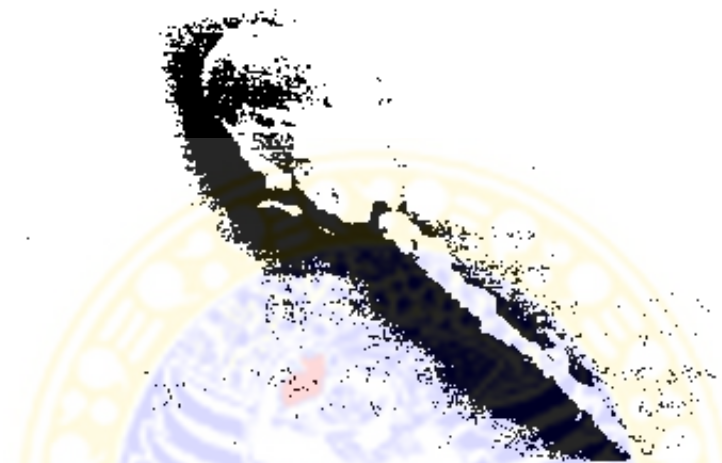
densitas percoll dengan 6 tingkat densitas (1,06 – 1,11g/ml) pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit didapatkan populasi spermatozoa Y sebesar 73,1 % pada densitas 1,06 g/ml dan terus menurun dengan meningkatnya densitas percoll, akhirnya pada sedimen (densitas 1,11 g/ml) didapatkan 17,4 %. Demikian juga Susilawati dkk. (1996) melaporkan bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien percoll diskontinus 10 tingkat densitas (1,027 – 1,070 g/ml) masing-masing 0,5 ml pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit cukup efektif pada spermatozoa sapi FH, didapatkan pada lapisan bawah diperoleh populasi spermatozoa X sebanyak $83,1 \pm 6,37\%$ dan spermatozoa Y sebanyak $16,9 \pm 4,86\%$. Setelah dilakukan inseminasi pada induk betina diperoleh anak berjenis kelamin betina sebanyak 82,5 % (33/40) dan berjenis kelamin jantan 18,3 % (7/40). Hasil yang hampir sama juga dilaporkan oleh Hossifien *et al.* (1999) yang melakukan pemisahan spermatozoa sapi potong dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll 12 tingkat pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit, setelah fertilisasi *in vitro* dengan suspensi spermatozoa lapisan bawah diperoleh embrio berjenis kelamin betina sebanyak 78,67 % dan embrio berjenis kelamin jantan sebanyak 11,33 %. Demikian juga hasil penelitian yang dilaporkan Dasrul dkk. (2000) pada spermatozoa kerbau lumpur yang dipisahkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 tingkat densitas (1,030 – 1,070 g/ml) masing-masing 1 ml pada kecepatan 2250 rpm selama 10 menit didapatkan pada lapisan bawah populasi

spermatozoa X sebanyak 74.68 ± 5.23 % dan spermatozoa Y sebanyak 25.37 ± 6.38 %. Setelah fertilisasi *in vitro* (FIV), diperoleh embrio berjenis kelamin betina sebanyak 67.68 ± 5.23 % dan embrio berjenis kelamin jantan sebanyak 35.32 ± 4.32 %. Namun demikian beberapa peneliti melaporkan bahwa pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi kerusakan integritas membran spermatozoa yang diikuti dengan penurunan kualitas fungsional seperti perubahan pola kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa serta penurunan daya tahan hidup spermatozoa (Brandeis and Manuel, 1993; Suzuki *et al.*, 1996 dan Susilawati, 2000).

2.4.1. Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap integritas membran spermatozoa

Kerusakan integritas membran spermatozoa setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll juga telah banyak dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Brandeis and Manuel (1993) menemukan adanya penurunan persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa manusia yang bermakna setelah perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinueus pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Sedangkan Susilawati (2000) menemukan adanya kerusakan struktur membran spermatozoa yang diikuti dengan penurunan motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 tingkat pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit.

Perubahan struktur membran spermatozoa sapi setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Gambaran perubahan ultrastruktur membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll (B) yang diamati dengan mikroskop elektron scanning pembesaran 10.000 X

Sementara itu Tanphaichirt *et al.* (1995) menemukan adanya penurunan kandungan fosfolipid membran spermatozoa kelinci secara bermakna setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 2 tingkat pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Penurunan kandungan DHA dan kolesterol membran spermatozoa manusia setelah sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinueus juga dilaporkan oleh Guzman *et al.* (2001)

Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll juga dilaporkan dapat menginduksi kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa. Grant *et al.* (1995) membuktikan ada peningkatan

spermatozoa manusia yang mengalami kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa sangat bermakna setelah pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll. Susilawati dkk. (1998) menemukan adanya peningkatan persentase kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa sapi FH yang sangat bermakna setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 tingkat pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit. Meningkatnya kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll, diakibatkan oleh terbuangnya zat-zat dekapasitasi seperti kolesterol dan fosfolipid dari membran plasma spermatozoa serta meningkatnya influks ion Ca^{2+} dalam sel, sebagaimana terlihat dengan adanya pendaran warna kuning pada bagian kepala spermatozoa setelah pewarnaan *chlortetracycline* (CTC) assay (Susilawati, 2000).

2.4.2. Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Pembentukan Senyawa Oksigen Reaktif (ROS)

Peningkatan pembentukan ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti terdahulu. Iwazaki and Gagnon (1992) menemukan adanya peningkatan akumulasi produksi ROS spermatozoa manusia 4 - 5 kali di atas kadar spermatozoa basal, setelah pemisahan dengan sentrifugasi sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinuus selama 20 menit pada kecepatan 2000 rpm. Ding *et al.* (1999) menemukan adanya peningkatan konsentrasi nitrit oksida

(NO₂) secara bermakna pada suspensi spermatozoa manusia setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontoneus. Demikian juga Agarwal *et al.*, (2003) menemukan peningkatan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa manusia yang bermakna ketika spermatozoa disentrifugasi beberapa kali putaran. Tingkat akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dipengaruhi oleh lama dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan. Makin lama waktu dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan makin tinggi akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa. Lamanya sentrifugasi mempunyai peran yang lebih penting daripada kecepatan sentrifugasi dalam menginduksi pembentukan ROS oleh spermatozoa (Agarwal *et al.*, 1994 dan Shakariz *et al.*, 1995).

Meningkatnya pembentukan ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diduga merupakan proses yang kompleks dan dapat berasal dari berbagai jenis reaksi kimiawi, organel maupun sel bahkan dapat berasal dari luar sel. Aitken and Clackson (1990) menyatakan bahwa ada berbagai proses biologis yang dapat menjadi modulator pembentukan ROS oleh spermatozoa diantaranya adanya kerusakan mekanik pada membran spermatozoa dan terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa. Adanya gesekan mekanik antara membran spermatozoa dengan partikel percoll atau dinding tabung selama proses sentrifugasi menyebabkan deformasi matriks ekstraselluler dan perubahan konduktivitas membran

spermatozoa. Keadaan ini menyebabkan kanal kalsium yang sensitif terhadap voltase terbuka karena sebab yang tidak spesifik. Terbukanya pintu masuk ion ini menyebabkan pemasukan ion Ca^{2+} ke dalam sel secara abnormal, sehingga mengakibatkan konsentrasinya dalam sel menjadi meningkat. Peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler akan menyebabkan peningkatan ikatannya dengan kalmodulin, membentuk Ca^{2+} -kalmodulin dependent protein kinase yang berperan penting untuk mengaktifkan enzim-enzim fosfolipase A_2 , enzim-enzim NADPH oksidase dan enzim protease. Enzim-enzim fosfolipase A_2 berperan penting untuk memecah fosfolipid menjadi asam lemak arakidonat. Aktivitas enzim ini sangat bergantung kepada kadar Ca^{2+} dan karena itu akan menjadi abnormal bila terjadi peningkatan Ca^{2+} yang bebas dalam sel (Halliwell and Gutteridge, 1999). Di samping itu peningkatan Ca^{2+} intraseluler juga akan menghasilkan asam lemak yang bebas dan nitrit oksida (NO°), yang dapat menimbulkan kematian secara langsung pada sel. NO° juga dapat membentuk ONOO^- yang mempunyai efek sitotoksik yang potensial (Orrenius, 1993). Pada beberapa sel tertentu seperti spermatozoa peningkatan Ca^{2+} kalmodulin dependent protein kinase akan mengaktifkan enzim-enzim NADPH oksidase untuk menghasilkan radikal superoksida anion dan enzim protease seperti *calpain* yang penting untuk merubah xanthin dehidrogenase menjadi xanthin oksidase (Halliwell and Gutteridge, 1999). Xanthin oksidase dengan bantuan oksigen akan merubah xanthin dan hipoxanthin membentuk radikal superoksida anion

(O_2^-). Dalam keadaan normal radikal superoksida anion melalui reaksi dismutase berubah menjadi senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2), kemudian H_2O_2 akan dinetralkan oleh enzim katalase atau glutathione peroxidase menjadi H_2O . Akan tetapi bila kadar enzim antioksidan yang terdapat pada spermatozoa rendah dan tidak mampu menetralkan senyawa radikal superoksida anion maka akan melalui reaksi *Haber Weiss* atau dengan bantuan Fe^{2+} dan Cu dalam reaksi Fenton berubah menjadi senyawa radikal hidroksil (Suryohudoyo, 2000).

Meningkatnya akumulasi produksi ROS spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas *percoll* juga dapat diakibatkan oleh terpisah atau hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa. Hasil penelitian Iwazaki dan Gagnon (1992) membuktikan bahwa pembuangan plasma seminalis dari spermatozoa melalui pembilasan berulang dengan sentrifugasi dapat meningkatkan pembentukan ROS oleh spermatozoa manusia 20 – 50 kali dari konsentrasi ROS spermatozoa basal (dari $8 \text{ mV/s}/10^9$ menjadi $406 \text{ mV/s}/10^9 \text{ sp}$). Akan tetapi penambahan kembali plasma seminalis pada pellet spermatozoa akan menurunkan konsentrasi ROS spermatozoa sebanyak 70 - 80 % (dari $406 \text{ mV/s}/10^9$ menjadi $61 \text{ mV/s}/10^9 \text{ sp}$).

2. 5. Radikal Bebas dan Senyawa Oksigen Reaktif

Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*) akhir-akhir ini menarik banyak perhatian dibidang kedokteran khususnya dalam bidang kesehatan reproduksi. Radikal bebas

dan ROS dianggap menjadi penyebab atau mendasari berbagai kejadian infertilitas seperti kerusakan integritas membran, penurunan motilitas dan daya fertilitas spermatozoa (de Lamirande *et al.*, 1997; Ollero *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2003 dan Aitken *et al.*, 2004).

2.5.1. Radikal Bebas

Dalam kepustakaan kedokteran radikal bebas sering dibaurkan dengan oksidan, karena memiliki sifat-sifat yang sama dalam merusak sel. Meskipun memiliki sifat-sifat yang sama, tetapi dipandang dari ilmu kimia radikal bebas dan oksidan berbeda. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbita luarnya (*unpaired electron*), sehingga untuk mencapai keadaan stabil elektron yang tidak berpasangan akan selalu mencari pasangannya dengan cara menarik (mengoksidasi) elektron atau berpindah ke (mereduksi) senyawa lain yang berdekatan, sedangkan oksidan merupakan senyawa yang menerima elektron atau senyawa yang menarik elektron (*electron acceptor*) (Widjaya, 1995). Jadi sama halnya dengan oksidan, radikal bebas adalah penerima elektron, namun perlu diingat radikal bebas adalah oksidan tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas. Radikal bebas lebih berbahaya daripada oksidan, karena radikal bebas mempunyai sifat reaktif yang tinggi dan dapat merubah suatu molekul menjadi radikal baru yang selanjutnya bila bereaksi dengan molekul lain akan membentuk radikal baru lagi sehingga terjadi reaksi berantai. Reaksi berantai ini akan berhenti bila radikal bebas tersebut

dapat diredam oleh senyawa-senyawa antioksidan (Suryohudoyo, 2000). Karena reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas tak stabil dan berumur pendek, sehingga sulit untuk dideteksi kecuali dengan metode-metode khusus seperti pengukuran EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) dan *Chemiluminescence* (Halliwell and Gutteridge, 1999). Beberapa contoh radikal bebas dapat dilihat pada table 2.2.

Tabel 2.2. Beberapa contoh-contoh Radikal bebas

No	Nama	Formula	Keterangan
1.	Atom hidrogen	H^\bullet	Radikal bebas yang sederhana
2.	Superoksida	$O_2^{\bullet-}$	Oxygen-centered radical
3.	Hidroksil	OH^\bullet	Merupakan <i>reactive oxygen-centered radical</i> yang menyerang seluruh biomolekuler
4.	Peroksil, Alkoksil	RO_2^\bullet, RO^\bullet	Oxygen-centered radicals yang terbentuk selama pembelahan peroksida dan reaksi radikal karbon dengan O_2
5.	Nitrogen Oksida	NO_2, NO_2^\bullet	NO_2^\bullet terbentuk secara in vivo dari asam amino L-arginin. NO_2^\bullet terbentuk bila bereaksi dengan O_2
6.	Thiy/Perthiy	RS^\bullet/RSS^\bullet	Kumpulan radikal yang mempunyai electron tidak berpasangan residu pada sulfur
7.	Triklorometil	CCl_3^\bullet	<i>Carbon centered radicals</i> biasanya bereaksi cepat dengan O_2 membentuk radikal peroksil
8.	Ion-ion logam transisi	Fe, Cu	Sering berupa katalisator yang kuat untuk reaksi radikal bebas

(Dikutip dari: Halliwell and Gutteridge; *Free radical in Biology and Medicine*, 1999; 37)

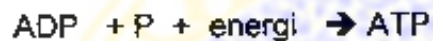
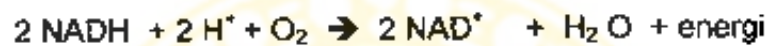
2.5.2. *Reactive Oxygen Specie (ROS)*

Reactive Oxygen Specie (ROS) merupakan sekelompok senyawa oksigen yang bersifat reaktif dan dapat merusak sel atau molekul yang ada disekitarnya dengan cara mengoksidasi atau mereduksi elektron dari/ke sel atau molekul lain yang ada disekitarnya (Halliwell and Guttridge, 1999).. ROS terbukti dapat menyebabkan disfungsi sel melalui perubahan fungsi protein struktur (enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matrik dan sitoskeleton), rantai DNA dan membran sel, sehingga integritas sel terganggu (Suryohudoyo,2000).

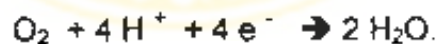
Secara umum ROS yang terlibat dalam berbagai proses biologis sel, sebagian besar berasal dari hasil metabolik normal oksigen (O_2), suatu senyawa yang diperlukan oleh semua organisme aerob untuk menghasilkan ATP melalui fosforilasi oksidatif yang terjadi di mitokondria. Dalam keadaan normal sekitar 85 – 90 % oksigen diperlukan oleh mitokondria untuk menghasilkan energi dalam bentuk ATP dan sekitar 3 – 5 % dari oksigen tersebut direduksi secara univalen menjadi ROS (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Pada hakekatnya produksi energi dihasilkan oleh metabolisme yang berasal dari material makanan yang teroksidasi. Mereka melepaskan elektron yang diterima oleh pengangkut elektron seperti *nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)*, *flavin mononucleotide (FMN)* dan *flavin adenine dinucleotide (FAD)* yang direduksi menjadi $NADH$, $FMNH_2$ dan $FAD H_2$. Hasil reduksi NAD ($NADH$) dan reduksi flavin ($FMNH_2$ dan

FADH₂) dioksidasi kembali oleh O₂ dalam mitokondria menghasilkan sejumlah ATP. Pada proses oksidasi ini dilakukan dalam beberapa langkah, sehingga energi dilepaskan secara berangsur-angsur. Hal ini diatur oleh sistem rantai transport elektron yang terdapat di membran intema mitokondria seperti sitokrom oksidase (Halliwell and Gutteridge, 1999). Secara sederhana transport senyawa reduktor reaksinya sebagai berikut;

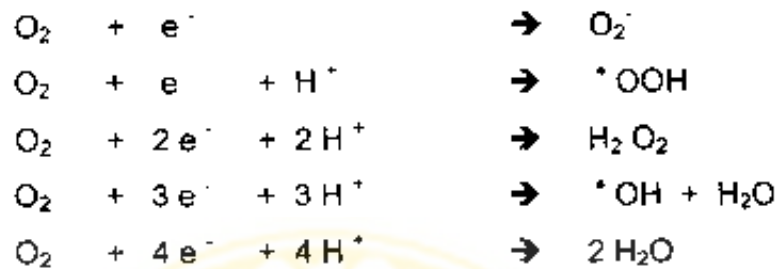


Hasil dari proses oksidasi yang terjadi pada proses transformasi energi metabolik tersebut, ternyata mempunyai efek samping berupa terbentuknya senyawa-senyawa radikal bebas. Halliwell and Gutteridge (1999) menyatakan bila molekul dioksidasi dengan oksigen, maka oksigen itu sendiri akan mengalami reduksi dengan membentuk berbagai-bagai bentuk intermediet. Pada proses ini terjadi reduksi O₂ menjadi H₂O yang secara sederhana dapat dituliskan sebagai berikut;



Reduksi oksigen menjadi H₂O dalam proses fosforilasi oksidatif memerlukan pengalihan 4 elektron, dimana pengalihan ke 4 elektron tersebut tidak dapat terjadi sekaligus, tetapi terjadi dalam 4 tahapan, setiap tahap hanya melibatkan pengalihan satu elektron. Bila pengalihan tersebut tidak berlangsung secara sempurna maka akan menyebabkan terbentuknya senyawa-senyawa oksigen reaktif seperti radikal

superoksida anion ($O_2^{\bullet -}$), radikal peroksil (OOH^{\bullet}), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^{\bullet}) (Halliwell, 1993). Secara sederhana reaksi reduksi oksigen tersebut dapat ditulis sebagai berikut;



Dari reaksi diatas dapat dilihat bahwa radikal peroksil, ion superoksida, hydrogen peroksida dan radikal hidroksil yang terjadi disebabkan karena pengalihan elektron yang kurang sempurna pada saat terjadi reduksi oksigen. Setiap pengalihan elektron kepada molekul oksigen akan menghasilkan senyawa oksigen reaktif. Penambahan satu elektron pertama pada molekul O_2 akan menyebabkan terbentuknya radikal superoksida anion, elektron kedua akan menghasilkan hydrogen peroksida dan elektron ketiga akan menghasilkan radikal hidroksil (OH^{\bullet}).

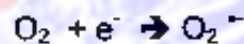
ROS yang terlibat dalam berbagai proses biologis organisme aerobik termasuk spermatozoa dapat diklasifikasikan dalam dua bentuk yaitu ROS yang berbentuk radikal bebas seperti radikal superoksida anion ($O_2^{\bullet -}$), radikal hidroksil (OH^{\bullet}); peroksil (RO_2^{\bullet}), alkoksil (RO^{\bullet}), hidroperoksil (HO_2^{\bullet}), dan ROS yang berbentuk non radikal seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), oksigen singlet (ΔgO_2), ozon (O_3) dan ion hipoklorit ($HOCl$). ROS yang berbentuk radikal bebas lebih berbahaya daripada ROS yang berbentuk non radikal, karena mempunyai sifat

reaktif yang tinggi dan dapat merubah suatu molekul menjadi radikal baru yang selanjutnya bila bereaksi dengan molekul lain akan membentuk radikal baru lagi sehingga terjadi reaksi berantai (Halliwell and Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000).

2.5.2.1. Radikal Superoksida anion ($O_2^{\cdot -}$)

Radikal superoksida anion ($O_2^{\cdot -}$) merupakan senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan oleh;

- i). karena pengalihan elektron yang tidak sempurna pada saat terjadi reduksi oksigen;



- ii). reaksi sampingan yang melibatkan Fe^{2+} seperti proses fosforitasi oksidatif;



- iii). proses oksigenasi hemoglobin dan prose hidroksitasi oleh enzim mono oksigenase sitokrom P450 dan sitokrom b4).



- iv). Aktivitas enzim NADH/NADPH oksidase yang terdapat dalam mitokondria dan granulosit;

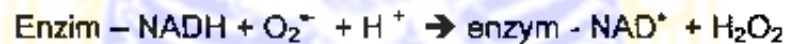


Atau dari reaksi yang melibatkan cytokrome oksidase

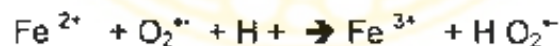
- v). melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim xanthin oksidase;



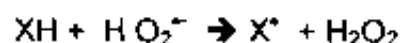
O_2^{\bullet} merupakan senyawa oksigen reaktif yang dapat menjadi sumber terbentuknya hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^{\bullet}). Reaktivitas O_2^{\bullet} tergantung pada kelarutannya dan pH. Dalam larutan aqueous, O_2^{\bullet} merupakan agen oksidasi yang lemah dan lebih cepat hilang, akibat reaksi dismutase dengan menghasilkan H_2O_2 . Reaksi dismutase akan terjadi lebih cepat pada pH yang asam, O_2^{\bullet} di dalam larutan aqueous akan bereaksi sebagai *reducing agent*. O_2^{\bullet} tidak mengoksidasi NADPH ataupun NADH, tetapi dapat berinteraksi dengan ikatan NADH dalam bentuk aktif enzim laktat dehidrogenase untuk membentuk NAD^{\bullet} radikal.



Di dalam larutan organik, O_2^{\bullet} biasanya bereaksi sebagai agen oksidasi terhadap senyawa-senyawa yang dapat menjadi donor ion H^+ seperti asam askorbat, katekol dan alfa tokoferol. Sedangkan di dalam larutan garam Fe, O_2^{\bullet} dapat akan bereaksi sebagai berikut;



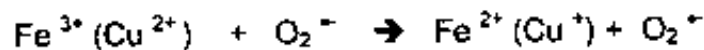
Jadi, O_2^{\bullet} dapat mereduksi Fe^{3+} , tetapi juga dapat mengoksidasi Fe^{2+} (Halliwell and Gutteridge, 1999). Seperti halnya radikal lain, radikal ini sangat reaktif dan akan membentuk radikal baru dan H_2O_2



$O_2^{\cdot -}$ akan sangat berbahaya apabila terdapat bersama-sama dengan H_2O_2 karena akan membentuk OH^{\cdot} melalui reaksi Haber-Weiss;



reaksi ini memerlukan ion Fe ataupun Cu dan diperkirakan terjadi melalui 2 tahap yaitu;



2.5.2.2. Radikal Hidroksil (OH^{\cdot})

Radikal hidroksil (OH^{\cdot}) merupakan satu bentuk ROS yang sangat berbahaya, dapat bereaksi dengan hampir semua substrat biologik seperti lipid, protein dan DNA, sehingga dianggap sebagai ROS yang sangat destruktif (de Lamirande *et al.*, 1997). Karena sifatnya yang sangat reaktif, radikal hidroksil tidak dapat bergerak jauh dan sangat sulit dihambat oleh sistem anti oksidan yang ada. Radikal hidroksil dapat terbentuk dari berbagai reaksi seperti;

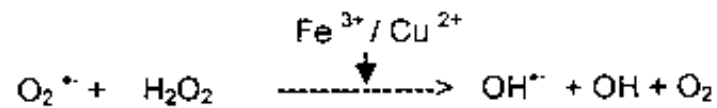
- pembelahan homolitik dari air



- melalui reaksi Fenton;



atau melalui reaksi *Haber-Weiss* dengan indikator ion Fe^{3+} dan Cu^{2+}

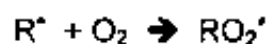


- degradasi dari ONOOH $\rightarrow \text{N}_2\text{O}^{\bullet} + \text{OH}^{\bullet}$
- reaksi ozon di dalam air ; $\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{OH} + \text{O}_2$

Radikal hidroksil dapat menyebabkan reaksi rantai dengan cara mengabstraksi satu atom hidrogen dari membran sel, yang selanjutnya menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang toksik terhadap sel termasuk malondialdehid (MDA), 9-hidroksi-nonenal, etana dan pentana (Suryohudoyo, 2000).

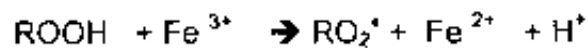
2.5.2.3. Radikal Peroksil (RO_2^{\bullet}) dan Radikal Alkoksil (RO^{\bullet})

Meskipun bukan produk primer proses biologis, tetapi (RO_2^{\bullet}) dan (RO^{\bullet}) secara umum merupakan bahan pengoksidasi yang baik. Radikal peroksil (RO_2^{\bullet}) dan radikal alkoksil (RO^{\bullet}) dapat memecah H^{\bullet} dari molekul-molekul lain seperti reaksi pada peroksidasi lipid. Disamping itu radikal peroksil dapat bereaksi satu sama lain dengan menghasilkan singlet oksigen (Halliwell and Gutteridge, 1999). Radikal peroksil dihasilkan akibat serangan OH^{\bullet} terhadap senyawa organik dengan menghasilkan *carbon-centered radicals*. Dengan kondisi aerobik akan bereaksi langsung dengan O_2 membentuk RO_2^{\bullet} .



Radikal peroksil juga dihasilkan oleh dekomposisi peroksida organik ((ROOH) dengan menghasilkan RO_2^{\bullet} . Kebanyakan peroksida

stabil pada temperatur ruangan, tetapi akan mengalami dekomposisi oleh panas, pemaparan sinar ultra violet (UV) atau pada penambahan ion logam transisi.



Reaksi ini terjadi pada stimulasi peroksidasi lipid oleh ion-ion logam transisi di dalam sistem biologik. HO_2^{\cdot} juga akan mengubah peroksida menjadi reaksi peroksil (Halliwell *and* Gutteridge, 1999).

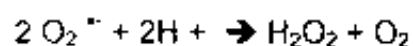
2.5.2.4. Hidrogen peroksida (H_2O_2)

Hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan senyawa oksigen reaktif non radikal, mempunyai titik didih 15°C , mudah bercampur dengan air, dapat melintasi membran sel dan mitokondria dengan cepat. Apabila di dalam membran sel terdapat Fe atau Cu, H_2O_2 akan segera bereaksi dengan ion-ion tersebut membentuk radikal hidroksil yang dapat menimbulkan kerusakan oksidatif pada lipid, protein dan DNA (Widjaya, 1996).

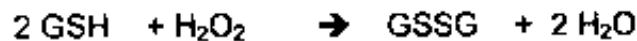
Dalam sel H_2O_2 terbentuk karena aktivitas enzim-enzim oksidase yang terdapat dalam retikulum endoplasmik dan peroksisom. Enzim tersebut mengkatalisis reaksi.



Hidrogen peroksida juga dapat terbentuk akibat enzim superoksida dismutase (SOD) meredam aktivitas radikal superoksida dengan mengkatalisis reaksi dismutase;



H_2O_2 merupakan bentuk ROS yang relatif stabil, tetapi mempunyai potensi oksidan yang tinggi dan dapat mengoksidasi berbagai senyawa yang terdapat di dalam sel misalnya glutation (Suryohudoyo, 2000).



Daya rusak H_2O_2 bukan hanya karena senyawa ini merupakan oksidan yang kuat, tetapi juga karena H_2O_2 dapat menghasilkan radikal hidroksil bila bereaksi dengan logam transisi Fe^{2+} dan Cu^+ yang disebut reaksi fenton.



Ion hidrogen peroksida menjadi sangat berbahaya bila terdapat bersama dengan ion superoksida, karena akan membentuk senyawa radikal hidroksil melalui reaksi Haber Weiss atau reaksi Fenton dengan katalisator Fe^{2+} dan Cu^+ .

2.5.2.5. Singlet Oksigen ($\Delta g\text{O}_2$).

Sebenarnya singlet oksigen bukan radikal bebas, karena tidak mempunyai elektron yang tidak berpasangan, tetapi merupakan bentuk yang reaktif dari O_2 karena kedua elektron tunggal disatukan dalam satu orbital dengan putaran yang berlawanan (Suryohudoyo, 2000). Singlet oksigen mempunyai 2 bentuk yaitu $\Delta g\text{O}_2$ dan $\Sigma^+\text{O}_2$ tetapi bentuk $\Sigma^+\text{O}_2$ sangat energetik dan sangat cepat melebur ke bentuk $\Delta g\text{O}_2$, sehingga bentuk inilah yang dikenal dengan singlet oksigen. Walaupun singlet oksigen bukan radikal bebas, tetapi ia dapat terbentuk dalam beberapa

reaksi radikal dan dapat menyebabkan pembentukan radikal yang lainnya (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.5.2.6. Ozon (O₃).

Merupakan gas yang berwarna biru pucat yang menyediakan stratospheric yang bersifat pelindung (global antioxidant) terhadap radiasi matahari pada lapisan yang tinggi atmosfer. Ozon diproduksi oleh fotodisosiasi O₂ menjadi atom oksigen yang kemudian bereaksi dengan molekul O₂.



Tidak seperti O₂, O₃ tidak merupakan radikal bebas, tetapi dalam bentuk *ground state*. ozon bersifat toksik dan merupakan polutan yang bersifat pengoksidasi yang tidak diinginkan. O₃ dapat mengoksidasi protein, lipid dan DNA (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2. 6. Antioksidan

Proses oksidasi yang terjadi pada proses transformasi energi metabolik akan menghasilkan sekumpulan zat lain yang dengan mudah membentuk ROS. Untuk menanggulangi pembentukan senyawa ini dan akibat yang ditimbulkannya pada organisme, maka organisme tersebut akan berusaha melindungi dirinya terhadap pengaruh ROS tersebut. Proses perlindungan ini dilakukan oleh golongan senyawa yang dapat merubah ROS menjadi senyawa yang tidak aktif yang antara lain dengan

cara mereduksi. Senyawa yang melakukan perlindungan ini dikenal dengan nama anti oksidan (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Dalam pengertian kimia, antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donors*), sedangkan dalam pengertian biologis, antioksidan mempunyai arti yang luas yang dapat didefinisikan sebagai suatu senyawa yang terdapat dalam kadar yang sangat rendah bila dibandingkan dengan substratnya dan secara signifikan dapat mencegah atau menghambat oksidasi substrat tersebut sehingga kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas terhadap sel dapat dicegah (Halliwell and Gutteridge 1993). Sedangkan Suryohudoyo (2000) mendefinisikan antioksidan sebagai senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk enzim dan protein pengikat logam.

Sebagai pertahanan terhadap radikal bebas, antioksidan akan berperan dengan berbagai-bagai cara;

1. Berperan sebagai penyapu, pembersih (*scavenger*) radikal bebas atau senyawa reaktif yang dihasilkan oleh proses oksidatif
2. Berperan sebagai pencegat (*interceptor*) terhadap radikal bebas tersebut
3. Berperan sebagai pengikat atau pengasingan (*sequester*) bahan-bahan pro-oksidan seperti ion Fe, Cu dan hem, sehingga pro-oksidan tersebut tidak bekerja
4. Berperan sebagai pelindung biomolekul terhadap kerusakan, terutama kerusakan oksidatif

Menurut tempat kerjanya dalam melakukan pertahanan terhadap radikal bebas, antioksidan dapat dibedakan atas

1. Antioksidan yang bekerja di tingkat sel.

Pada dasarnya antioksidan ini mempunyai fungsi sebagai antioksidan pencegah terbentuknya radikal hidroksil. Antioksidan yang berperan disini adalah enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathione peroksidase.

2. Antioksidan yang bekerja di membran sel

Kelompok ini berfungsi sebagai pemutus rantai. Antioksidan yang termasuk kelompok ini adalah vitamin E, vitamin C, betakaroten dan koenzim Q

3. Antioksidan yang bekerja ekstraseluler

Kelompok ini berfungsi mencegah terbentuknya logam transisi Fe dan Cu. Antioksidan yang termasuk kelompok ini adalah transferrin, laktoferin, seruloplasmin (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Berdasarkan aktivitasnya dalam meredam dampak negatif radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif, antioksidan dapat dibagi dalam dua kelompok yaitu antioksidan pencegah (*preventive antioxidants*) dan antioksidan pemutus rantai (*chain-breaking antioxidant*).

1. Anti-oksidaan pencegah (*preventive antioxidants*)

Antioksidan pencegah (*preventive antioxidants*) pada dasarnya antioksidan yang mencegah pembentukan radikal bebas baru. Antioksidan ini mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul

yang kurang mempunyai dampak negatif sebelum radikal bebas tersebut mempunyai kesempatan bereaksi atau dengan mencegah pembentukan radikal bebas baru dari molekul lain. Antioksidan yang termasuk pada antioksidan pencegah adalah; superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GSPx)

2. Antioksidan pemutus reaksi rantai (*chain-breaking antioxidant*)

Antioksidan pemutus reaksi rantai (*chain-breaking antioxidant*) adalah antioksidan yang berfungsi meredam dampak negatif dari senyawa oksigen reaktif dengan cara mencegah reaksi rantai. Yang termasuk antioksidan pemutus rantai adalah vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (asam askorbat), β -karotin, glutathion dan sistein. Vitamin E dan β -karotin bersifat lipofilik, sehingga dapat berperan pada membran sel untuk mencegah peroksidasi lipid. Sebaliknya vitamin C, glutathion dan sistein bersifat hidrofilik dan berperan dalam sitosol. Vitamin E dapat bereaksi dengan radikal lipid (L^*) dan radikal peroksilipida (LOO^*).

2.6.1. Superoksida dismutase (SOD)

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang berada dalam semua sel tubuh, bersifat hidrofilik, berfungsi untuk mengkatalisis anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) yang nantinya akan dihancurkan oleh katalase atau glutathion peroksidase. Sifat radikal yang tinggi dari $O_2^{\cdot-}$ akan dirubah oleh SOD menjadi H_2O_2 yang kurang reaktif (Suryohudoyo, 2000)



Superoksida dismutase di dalam tubuh ditemukan dalam dalam mitokondria berupa Mn-SOD dan dalam sitosol berupa Cu, Zn SOD.. Superoksida dismutase juga ditemukan ekstraseluler berupa Ec-SOD (Halliwell and Gutteridge, 1999; Mates and Jimenez, 1999).

2.6.1.1. Manganese Superoksida Dismutase (Mn-SOD)

Mn-SOD adalah golongan enzim homotetramer dengan 96 kDa, berisi 1 atom Mn-persubunit yang berputar dari Mn (II) menjadi Mn²⁺ dan kembali menjadi Mn (III) selama dua langkah dismutase superoksida.



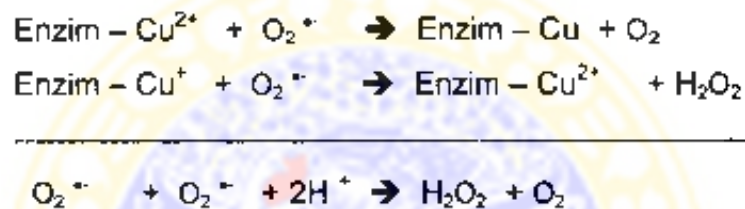
Mitokondria secara kuantitatif merupakan tempat produksi utama dari ROS di dalam sel, dimana diperkirakan 1 % oksigen yang dipergunakan untuk respirasi mitokondria diubah menjadi O₂^{·-} (Widodo, 2003). Mn-SOD dipercaya sebagai antioksidan yang mempunyai fungsi membersihkan (scavenger) radikal superoksida. Dengan ini dapat dikatakan bahwa ekspresi Mn-SOD penting untuk kelangsungan hidup aerobik dan perkembangan resisten seluler terhadap toksisitas yang dimediator oleh radikal oksigen (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.6.1.2. Copper, Zinc Superoksida Dismutase (Cu, Zn SOD)

Cu Zn-SOD adalah golongan enzim SOD homodimer, mempunyai 2 subunit protein dengan berat molekul ± 32 KDa. Masing-masing mengandung 1 ion Cu dan 1 ion Zn pada tempat yang aktif dengan

dijembatani oleh ligan biasa (Mates and Jimenez, 1999). Pada sel Cu Zn-SOD terdapat pada sitosol, tetapi beberapa juga terdapat pada lisosom, nukleus dan ruang antar membran luar dan dalam mitokondria (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Cu, Zn-SOD dipercaya memainkan peran penting pada lini pertahanan antioksidan dengan mengkatalisis dismutase anion superoksida radikal membentuk H_2O_2 dan O_2



2.6.1.3. Superoksida dismutase ekstra selluler (Ec-SOD)

Superoksida dismutase ekstra selluler (Ec-SOD) merupakan golongan enzim tetrametrik dengan berat molekul 135 Kda, masing-masing unit berisi Cu dan Zn. Ada bermacam-macam bentuk Ec-SOD yaitu A, B dan C. B dan C terikat pada heparin. Kelihatannya Ec-SOD terikat pada permukaan sel yang berhubungan dengan permukaan sel yang berbentuk karbohidrat terutama pada dinding pembuluh darah (Halliwell and Gutteridge, 1999)..

Ec-SOD tidak diinduksi oleh subunitnya ataupun oksidan lain dan regulasinya di dalam jaringan mammalia terutama dikoordinasi oleh sitokin dari pada respon terhadap oksidan. Mencit transgenik yang mempunyai Ec-SOD knock out, terlihat normal, tetapi mereka dapat menderita kerusakan paru dan kematian lebih cepat bila dipapar dengan O_2 murni

dan memperlihatkan peradangan yang hebat pada paru-paru bila dipapar dengan ozon pada dosis 1,5 pp (*part per billion*) (Mates and Jimenez, 1999).

Sel mempunyai kemampuan untuk meningkatkan produksi SOD bila diperlukan misalnya dalam keadaan fisiologis, kadar SOD yang ada mencukupi untuk meredam produksi ROS yang terbentuk. Bila produksi dari ROS meningkat sampai batas tertentu peningkatan produksi SOD masih dapat mengatasi produksi ROS yang terbentuk, namun bila peningkatan ROSnya sangat tinggi, peningkatan produksi SOD tidak dapat ditingkatkan lagi sehingga kadar ROS meningkat melebihi peningkatan SOD (Halliwell and Gutteridge, 1999). Beberapa peneliti juga melaporkan SOD dalam jumlah yang terlalu kecil atau dalam jumlah yang terlalu besar tidak mempunyai efek proteksi, dengan diperlihatkan terjadinya kerusakan dan kematian sel, hal ini terlihat dengan adanya peningkatan kadar enzim LDH (Halliwell and Gutteridge, 1999). Meskipun enzim SOD berfungsi mengkatalisis $O_2^{\cdot-}$, tetapi telah dapat dibuktikan bahwa SOD dapat bereaksi langsung dengan OH^{\cdot} , radikal peroksil atau alkohol dan singlet oksigen, karena SOD berisi histidin dari sisi rantai lain yang bereaksi dengan senyawa-senyawa ini. Bila sejumlah SOD ditambahkan kepada system yang memproduksi ROS akan terjadi penghambatan kerusakan membran (Halliwell and Gutteridge, 1999). Di samping itu SOD juga melindungi inaktivasi dehidratase terhadap radikal superoksida (Mates and Jimenez, 1999).

Pada spermatozoa, enzim SOD sangat penting peranannya dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan keutuhan integritas membran spermatozoa (Aitken *et al.*, 1994). Telah dibuktikan bahwa penambahan enzim SOD secara eksogen pada medium dapat mencegah terjadinya kerusakan integritas membran spermatozoa (Alvarez *et al.*, 1992). Aktivitas SOD berkorelasi positif dengan keutuhan integritas membran (Alvarez *et al.*, 1994) dan motilitas spermatozoa (Sujarwo, 2001).

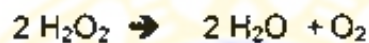
Aktivitas SOD dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer, metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Oberley dan Spitz (1985). Satu unit aktivitas SOD didefinisikan sebagai jumlah SOD yang dihasilkan melalui kompetisi dengan NBT (nitro blue tetrazolium) 50 % dalam system spesifik. Sedangkan Kelso *et al.* (1997) mendefinisikan satu unit aktivitas SOD adalah jumlah SOD yang diperlukan untuk menghambat pembentukan bahan warna formazen 50 % dibawah kondisi spesifik.

2.6.2. Katalase

Katalase merupakan enzim tetramik-haemin yang terdiri dari 4 subunit protein, yang masing-masing berisi senyawa hem ferri yang terikat pada tempat aktivitasnya. Masing-masing sub unit biasanya mempunyai 1 molekul NADPH yang terikat pada protein tersebut. Wijaya (1996) menjelaskan bahwa katalase terdapat dalam sitosol dan mitokondria, enzim ini berfungsi merubah hydrogen peroksida menjadi oksigen dan air. Pada jaringan aktivitas katalase terutama terdapat pada peroksisom.

Mitokondria dan retikulum endoplasma berisi sedikit katalase. Aktivitas katalase yang dideteksi pada jaringan homogenat, mungkin disebabkan oleh rusaknya peroksisom yang merupakan organel yang mudah pecah selama homogenisasi (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Katalase merupakan enzim antioksidan yang mencegah kerusakan akibat serangan senyawa oksigen reaktif, yaitu dengan cara merubah H_2O_2 yang dihasilkan akibat dismutase $O_2^{\cdot-}$, menjadi air dan oksigen ;



Mekanisme reaksi enzim katalase dalam merubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen dapat ditulis sebagai berikut.



Walaupun enzim-enzim aerobik lain dapat menghilangkan H_2O_2 , tetapi enzim katalase memainkan peranan penting di dalam perolehan tambahan respon adaptasi sel terhadap stress oksidatif dengan mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Dengan cara ini katalase dapat memelihara konsentrasi O_2 yang akan digunakan untuk menghilangkan siklus reduksi kimia atau untuk berinteraksi langsung dengan toksin (Widjaya, 1996). Dalam beberapa kasus penambahan katalase dapat memberikan kontribusi besar untuk mencegah peroksidasi lipid membran spermatozoa dan menurunkan motilitas spermatozoa manusia (Alvarez and Storoy, 1995).

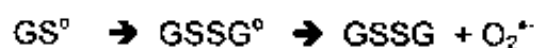
2.6.3. Golongan Glutation Peroksidase (GPx)

Golongan Glutation Peroksidase (GPx) merupakan enzim antioksidan yang berperan penting dalam melindungi sel, dengan cara memusnahkan hydrogen peroksida yang dihasilkan oleh SOD menjadi air. GPx terdapat dalam sitoplasma dan mitokondria. Enzim GPx berperan penting dalam melindungi sel, tidak saja dari H_2O_2 tetapi juga dari peroksida organik yang terbentuk pada oksidasi kolesterol dan asam lemak dengan menggunakan glutation (GSH), sehingga akan melindungi sel mamalia terhadap kerusakan oksidatif (Halliwell, 1993).

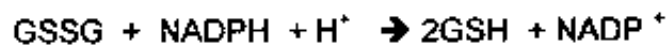


Glutation (GSH) di samping berfungsi sebagai ko-faktor untuk golongan glutation peroksidase, juga terlibat di dalam berbagai proses metabolic seperti metabolisme asam askorbat, komunikasi antar sel dan secara umum mencegah oksidasi serta iktan silang -SH. GSH juga terlibat dalam transportasi Cu intraseluler dan dapat melakukan chelat ion Cu dengan menghancurkan kesanggupan Cu menghasilkan radikal bebas (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Secara *in vitro* GSH dapat bereaksi dengan $OH\cdot$, $HOCl$, peroksid nitrit, $RO\cdot$, $R O_2\cdot$, carbon centered radicals. Reaksinya dengan radikal bebas akan menghasilkan radikal thyl (GS°). Radikal thyl akan menghasilkan $O_2\cdot^-$ dengan reaksi;

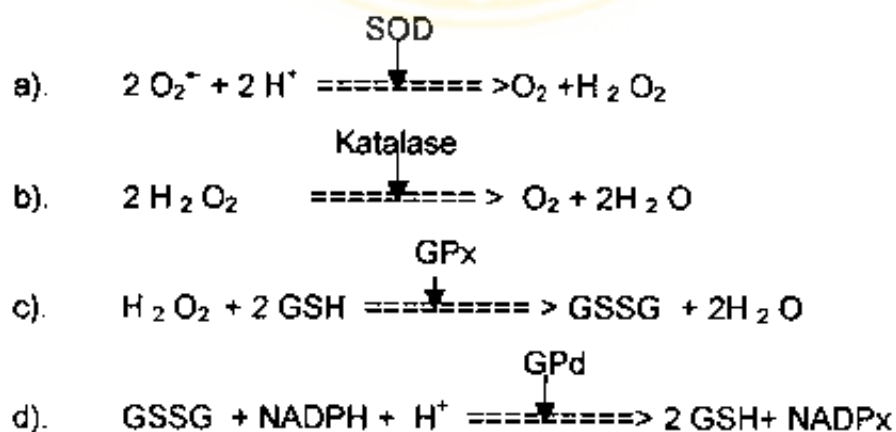


Di dalam tubuh kadar GSH dipertahankan melalui siklus redoks glutation. Ini dilakukan oleh enzim glutation reduktase dan NADPH yang mengkatalisis reaksi



GSH mengandung gugusan SH (gugusan thiol) yang relatif tinggi, dimana gugusan SH merupakan gugusan yang penting untuk mengurangi efek dari ROS. Dalam keadaan stres oksidatif berat, GSH dapat berikatan dengan disulfida campuran (Asikin, 2000).

Dilaporkan oleh banyak peneliti terdahulu bahwa sistem antoksidan pemutus rantai tidak dapat bekerja secara individual, akan tetapi perlu bekerja sama satu dengan lainnya sebagai suatu jaringan, dimana aktivitasnya merupakan suatu rangkaian reaksi kimia yang melibatkan berbagai jenis antioksidan. Gangguan pada salah satu mata rantai reaksi dapat menurunkan efektivitas fungsi antioksidan dan dapat menimbulkan keadaan yang kontraproduktif (Halliwell, 1993). Secara sederhana reaksinya dapat dilihat sebagai berikut;



Dari reaksi-reaksi di atas dapat dijelaskan bahwa proses dismutasi $O_2^{\cdot -}$ oleh SOD akan menghasilkan H_2O_2 yang harus diuraikan menjadi H_2O oleh enzim katalase atau glutathion peroksidase. Bila aktivitas SOD dengan katalase atau glutathion peroksidase tidak seimbang maka akan terjadi penumpukkan H_2O_2 yang dapat menyebabkan keadaan yang merugikan, karena dapat menghambat aktivitas enzim SOD serta molekul tubuh lain. Disamping itu H_2O_2 juga dapat membentuk radikal hidroksil yang lebih reaktif bila bertemu dengan Fe^{2+} atau Cu^+ (reaksi Fenton) atau dengan $O_2^{\cdot -}$ (reaksi Haber Waiss). Proses reduksi H_2O_2 oleh glutathion peroksidase akan menghasilkan senyawa GSSG yang seterusnya akan direkonversi menjadi GSH oleh enzim glutathion reduktase dengan menggunakan ko-substrat NADPH (Suryohudoyo, 2000). Di dalam keadaan fisiologis adanya oksidan atau senyawa oksigen reaktif diredam oleh proteksi tubuh dengan cara memproduksi antioksidan yang memadai. Namun pada keadaan tertentu timbul ketidak seimbangan antara oksidan dan antioksidan yang dapat disebut *oxidative stress*.

2.7. Pengaruh ROS terhadap fungsi Spermatozoa

Pengaruh ROS pada spermatozoa telah banyak dilaporkan sebelumnya oleh beberapa peneliti. ROS dalam konsentrasi normal diperlukan sebagai mediator penting terhadap fungsi spermatozoa dan terlibat dalam induksi hiperaktivasi, kapasitasi dan reaksi akrosom serta fusi spermatozoa dengan sel telur. Hasil penelitian Aitken *et al.* (1994) membuktikan bahwa spermatozoa manusia yang dipaparkan dengan $O_2^{\cdot -}$

(dalam medium yang ditambahkan *xanthin plus xanthin oksidase*) menunjukkan hiperaktivasi dan kapasitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa yang diberi perlakuan dengan serum fetal cord (penginduksi kapasitas). Demikian juga hasil penelitian Griveau *et al.* (1994) membuktikan bahwa, penambahan konsentrasi rendah H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/l}$) dalam medium B2 Menezo akan mempercepat perkembangan hiperaktivasi spermatozoa (sebesar 37%) dan kapasitas spermatozoa (sebesar 43%) setelah inkubasi selama 3 jam. Hasil yang sama juga dibuktikan oleh Zini *et al.* (1995) bahwa konsentrasi NO^* yang rendah, yang dibebaskan secara lambat dari agen-agen seperti *diethylamine-NONOate* dan *spermine-NONOate* (0.1mmol/ml), dapat menginduksi peningkatan kapasitas spermatozoa manusia sebesar 85 -100% tanpa mempengaruhi motilitas spermatozoa. Namun demikian bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralsir oleh sistem pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa atau plasma semen dapat menyebabkan kerusakan asam lemak khususnya asam lemak poli tak jenuh yang merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran sel spermatozoa, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA, selanjutnya menyebabkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995). Dilaporkan oleh beberapa peneliti terdahulu bahwa tingkat kerusakan membran oleh ROS bukan hanya bergantung pada sifat dan jumlah ROS yang dilibatkan tetapi juga bergantung pada momen dan durasi/lamanya paparan ROS serta faktor-

faktor lain seperti temperatur, tekanan oksigen dan komposisi lingkungan sekitarnya (Aitken *et al.*, 1994; de Lamirande *et al.*, 1997 dan Agarwal *et al.*, 2003).

2.7.1. Peroksidasi Lipid Membran Spermatozoa

Peroksidasi lipid merupakan salah satu proses yang menggambarkan terjadinya kerusakan oksidatif dari asam lemak poli tak jenuh (*polyunsaturated fatty acid/ PUFA*) sebagai konsekuensi dari peningkatan konsentrasi senyawa oksigen reaktif dalam sel atau organ. Alvarez and Storey (1995) menyatakan bahwa sebagian besar lipid membran spermatozoa mengandung asam lemak poli tak jenuh yang memiliki ikatan kembar karbon tak terkonjugasi yang dipisahkan oleh gugus methylene. Keberadaan ikatan kembar di dekat gugus methylene menyebabkan ikatan *methylene carbon – hydrogen* jadi lebih lemah dan lebih rentan mengalami abstraksi. Kalau abstraksi ini telah terjadi, radikal yang dihasilkan distabilkan dengan cara penyusunan ulang ikatan-ikatan kembar yang membentuk "*conjugated diene radical*". Hal ini membuktikan bahwa lipid yang mengandung banyak ikatan rangkap terinterupsi-methylene sangat rawan terkena peroksidasi. Aitken *et al.* (1998) menyatakan bila asam lemak poli tak jenuh bereaksi dengan radikal hidroksil (salah satu bentuk ROS) akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Mekanisme peroksidasi lipid pada membran sel terjadi melalui 3 tahap yaitu tahap permulaan (inisiasi), tahap penggandaan (propagasi) dan tahap akhir (terminasi).

a. Inisiasi

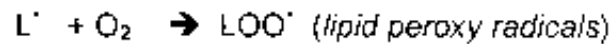
Tahap ini merupakan langkah pertama dari serangkaian peroksidasi yang terjadi pada asam lemak poli tak jenuh. Reaksi ini dihasilkan akibat serangan beberapa spesies pada allylik hydrogen pada atom karbon diantara ikatan rangkap dua (Halliwell and Gutteridge, 1999). Akibat serangan ini akan terjadi pemisahan atom H dari group metilen (-CH₂-). Oleh karena atom hydrogen hanya berisi satu elektron, pemisahan ini akan menghasilkan elektron yang tidak berpasangan pada karbon (-CH[•]-) sehingga terbentuk asam lemak radikal (*fatty acid radical*)



Karbon radikal biasanya distabilkan oleh penyusunan molekul untuk membentuk *conjugated dienes*. Karbon radikal yang terbentuk dapat mengalami berbagai-bagai reaksi seperti 2 di antara mereka akan saling bertabrakan di dalam membran, sehingga dapat menjadi inisiator pada proses ini. Kebanyakan dari karbon radikal (*carbon-centered radicals*) akan bereaksi dengan O₂ (Comporti, 1993; Halliwell and Gutteridge, 1999).

b. Propagasi

Karbon radikal atau lemak radikal merupakan suatu radikal dengan pusat karbon (*carbon centered radicals*) yang mudah bereaksi dengan oksigen membentuk radikal asam lemak yang berpusat pada oksigen (*oxygen-centered radicals*) yang disebut radikal lemak peroksi (*lipid peroxy radicals/LOO[•]*).

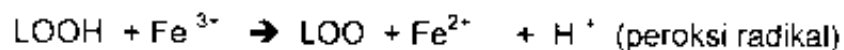
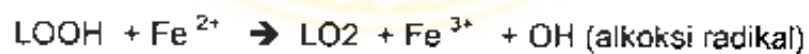


Lipid peroxy radicals ini dapat memecah hydrogen dari FUPA yang berdekatan, sehingga membentuk lipid hidroperoksida (LOOH) yang biasa disebut juga lipid peroksida.



Reaksi *lipid peroxy radicals* dengan PUFA akan menghasilkan lipid radikal yang baru, sehingga menambah jumlah radikal lipid pada reaksi rantai ini (Halliwell and Gutteridge, 1999). Fase ini disebut fase propagasi dimana terjadi reaksi dari radikal peroksil dengan PUFA yang lain membentuk hidroperoksid dan radikal lemak yang baru, sehingga mempertahankan jumlah radikal di dalam reaksi berantai tersebut.

Dekomposisi dari hidroperoksida dikatalisator oleh ion Fe dan logam transisi lainnya dengan menghasilkan alkoksi radikal dan peroksi radikal, sehingga meningkatkan propagasi. Akibatnya generasi yang kedua dari radikal bebas dapat menginisiasi pembentukan rantai baru dari lipid peroksida



c. Terminasi

Reaksi rantai ini dapat berakhir bila terjadi penggabungan 2 lipid radikal untuk membentuk hasil asam lemak yang non radikal atau antara radikal dengan suatu senyawa pembasmi radikal,



Secara umum peroksidasi lipid akan menyebabkan penurunan pengaliran cairan melalui membran. Hal ini akan memudahkan fosfolipid diantara dua monolayer bertukar, sehingga meningkatkan kebocoran membran bilayer terhadap substansi yang secara normal tidak boleh melalui saluran tersebut (seperti ion Ca). Ikatan silang yang terjadi pada membran protein menyebabkan menurunnya mobilitas terhadap lateral dan rotasional dari membran ini, sehingga akan mengurangi fungsi membran. Produksi hidroperoksida dan karbonil pada regio hidrofosfolipid menyebabkan pembentukan pusat hidrofilik yang akan mempengaruhi fungsi membran. Hal ini akan meningkatkan permeabilitas membran, sehingga akan terjadi pembengkakan pasif mitokondria, pembentukan vesikula pada retikulum endoplasma, kebocoran enzim dan ko-enzim ke sel yang tersisa dan menimbulkan kerusakan yang lebih lanjut (Halliwell and Guttridge, 1999). Oksidasi yang berlanjut dari rantai samping asam lemak dan fragmentasi asam lemak ini akan menghasilkan komposisi kompleks lipid *hydroxyperoxide* dan produk akhir aldehydik antara lain *malondialdehida (MDA)*, *9-hidroksinonenal (HNE)* dan berbagai hidrokarbon (*etana/C₂H₆* atau *pentana/C₅H₁₂*) yang toksik terhadap sel dan dapat menyebabkan membran kehilangan integritas (Aitken *et al.*, 1994; Griveau *et al.*, 1995 dan Sudjarwo, 2001).

Malondialdehyde (MDA), kadang-kadang disebut juga malonaldehid, merupakan salah satu golongan aldehyd yang dihasilkan akibat peroksidasi PUFA yang mempunyai lebih ikatan rangkap seperti asam

linoleat, asam arakhidonat dan *decoxahexahexanoid acid* (DHA) membran. Oleh karena itu peningkatan kadar MDA dalam suspensi lazim digunakan sebagai salah satu indikator untuk peroksidasi lipid membran (Alvarez and Storey, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999). MDA terdapat dalam bermacam-macam bentuk, tergantung pada pH. Bila pH rendah reaktivitasnya akan meningkat (Halliwell and Guttridge, 1999). Dalam kondisi fisiologis, MDA dengan mudah menyerang protein dibandingkan dengan asam amino bebas, sehingga akan menghasilkan bermacam-macam residu seperti lisin, ikatan rangkap intra dan intermolekul protein. Disamping itu MDA juga akan bereaksi dengan basa DNA yang dapat menimbulkan lesi mutagenik. Kadar MDA dalam suspensi dapat ditentukan dengan berbagai macam metode, satu diantaranya melalui metode *thio barbituric acid* (TBA) (Sodergren, 2000). Pengukuran kadar MDA dengan metode TBA didasarkan pada pengukuran secara spektroskopi terhadap banyaknya produk sekunder yang dihasilkan selama terjadi autooksidasi. MDA yang dihasilkan dari pemutusan asam lemak poli tak jenuh dapat bereaksi dengan TBA dan membentuk kompleks berwarna merah. Menurut Frankel (1998) intensitas warna sesuai dengan jumlah malonaldehid dan sebanding dengan kerusakan lipid. Intensitas warna merah atau pink dapat ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm.

2.7.2. Peroksidasi Protein Spermatozoa

Protein adalah suatu makro molekul penyusun membran spermatozoa berupa enzim, reseptor, antibodi dan matrik sitoskeleton yang mudah mengalami hidrolisis secara enzimatik dengan proteinase. Telah banyak bukti menunjukkan bahwa ROS dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi protein seperti enzim, reseptor, jalur transduksi sinyal, transport protein dan enzim yang memerlukan konsentrasi ion Ca bebas yang rendah intraselluler, karena ROS dapat mengadakan reaksi dengan asam-asam amino penyusun protein. Diantara asam-asam amino yang paling rawan terhadap oksidasi radikal oksigen adalah sistein, karena sistein mengandung gugusan sulfhidrif (-SH) yang sangat peka terhadap ROS atau dapat bereaksi langsung dengan ion logam transisi, sehingga membentuk thyl radicals



Kerusakan protein oleh serangan ROS, bukan saja merusak fungsi enzim, tetapi juga mengganggu fungsi reseptor (seperti β adreno reseptor dan α_1 adrenergik reseptor) dan transportasi oleh protein. Kerusakan dapat terjadi pada protein yang terlibat di dalam mempertahankan keseimbangan ion intraselluler seperti Ca^{2+} -ATPase dan sistem keseimbangan pertukaran Ca^{2+} dan Na^{+} yang menjaga Ca^{2+} intraselluler tetap rendah dari ekstra selluler (Halliwell and Gutteridge,1999). Sistem Na^{+} , K^{+} -ATPase di dalam membran plasma penting untuk menjaga konsentrasi K^{+} intraselluler tetap tinggi dan Na^{+} intraselluler lebih rendah

dibandingkan dengan ekstraseluler. Ca^{2+} -ATPase dan Na^+ , K^+ -ATPase mengandung gugus sulfidril (-SH) yang sangat rawan terhadap serangan radikal hidroksil. Suryohudoyo (2000) menyatakan bahwa kerusakan gugus SH oleh radikal hidroksil akan menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel, sehingga terjadi ketidakseimbangan ion intraseluler yang selanjutnya akan mempengaruhi fungsi sel (Phelp *et al.*, 1999).

Kerusakan oksidatif protein dapat terjadi karena serangan langsung ROS atau akibat produk akhir peroksidasi lipid seperti MDA dan HNE sehingga menimbulkan apa yang disebut dengan AGE (*advanced glycosylated endproduct*) yang dapat merusak fungsi biologis protein (Widjaya, 1996). Bila kerusakan oksidatif terjadi pada protein fungsional seperti enzim-enzim glikolitik akan menyebabkan kehilangan aktivitas katalitiknya, sedangkan bila peroksidasi terjadi pada protein penyusun struktur membran sel, maka akan terjadi gangguan aktivitas membran seperti rusaknya reseptor dan berubahnya sifat permeabilitas membran (Hughes *et al.*, 1999). Sementara itu Halliwell and Gutteridge (1999) melaporkan kerusakan enzim perbaikan DNA (endonuklease, ligase) dapat meningkatkan kerusakan oksidatif DNA dan meningkatkan frekuensi mutasi. Sedangkan kerusakan pada polimerase DNA dapat menyebabkan pengurangan replikasi DNA.

2.7.3. Peroksidasi DNA Spermatozoa

DNA disusun oleh nukleotida adenin, timin, guanin dan sitosin merupakan molekul yang sangat stabil, tetapi dapat mengalami dekomposisi kimia secara spontan sepanjang hidupnya. Kehilangan purin dapat muncul 10^4 kali perhari didalam genom manusia. Sitosin dapat kehilangan secara pelan-pelan group aminonya (deaminasi) menjadi bentuk urasil, sedangkan 5-metil sitosin di dalam DNA dapat mengalami deaminasi menjadi timin (Sakkas *et al.*, 1999). Kerusakan DNA secara kimiawi oleh beberapa senyawa oksigen reaktif telah banyak diperlihatkan pada penelitian *in vitro*. Kerusakan oksidatif DNA menghasilkan putusnya rantai, kerusakan pada deoksiribosa dan modifikasi basa purin dan pirimidin (Halliwell and Gutteridge, 1999). Kerusakan satu rantai DNA biasanya mudah diperbaiki, tetapi kerusakan kedua rantai akan menimbulkan problem yang serius. Rantai DNA yang putus yang disebabkan oleh stress oksidatif ini dapat dideteksi dengan bermacam-macam teknik penentuan DNA. Putusnya rantai DNA akan menimbulkan perubahan konfigurasi DNA (Suryohudoyo, 2000).

Beberapa penelitian *in vitro* telah membuktikan bahwa spermatozoa yang dipaparkan dengan senyawa oksigen reaktif buatan dapat menyebabkan meningkatnya kerusakan DNA secara bermakna dalam bentuk putusnya rantai, kerusakan pada deoksiribosa dan modifikasi basa purin dan pirimidin (Agarwall *et al.*, 2003). Stress oksidatif juga dikorelasikan dengan tingginya frekwensi terputusnya untai DNA

tunggal dan ganda. Bukti yang kuat menunjukkan bahwa kadar ROS yang tinggi mempermudah terjadinya frakmentasi DNA. Donnelly *et al.*, (1999) menyatakan bahwa kerusakan DNA oleh ROS dapat menyebabkan menurunnya bioenergi sel sehingga proses fosforilasi oksidatif untuk menghasilkan ATP untuk kehidupan dan pergerakan spermatozoa menjadi berkurang. Dilaporkan oleh Ozawa (1995) guanin merupakan salah satu nukleotida DNA yang sangat rentan terhadap serangan ROS. Guanin bila bereaksi dengan radikal hidroksil akan menghasilkan senyawa 8-hidroksi deoksiguanosin (8-OH-dG). Terdapat korelasi yang sangat bermakna peningkatan kadar 8-OH-dG dengan tingkat kerusakan integritas DNA dan motilitas spermatozoa (Sujarwo, 2001). Dengan demikian peningkatan senyawa 8-OH-dG dapat dipakai sebagai salah satu indikator kerusakan integritas DNA spermatozoa akibat peroksidasi.

2.7.4. Penurunan motilitas spermatozoa

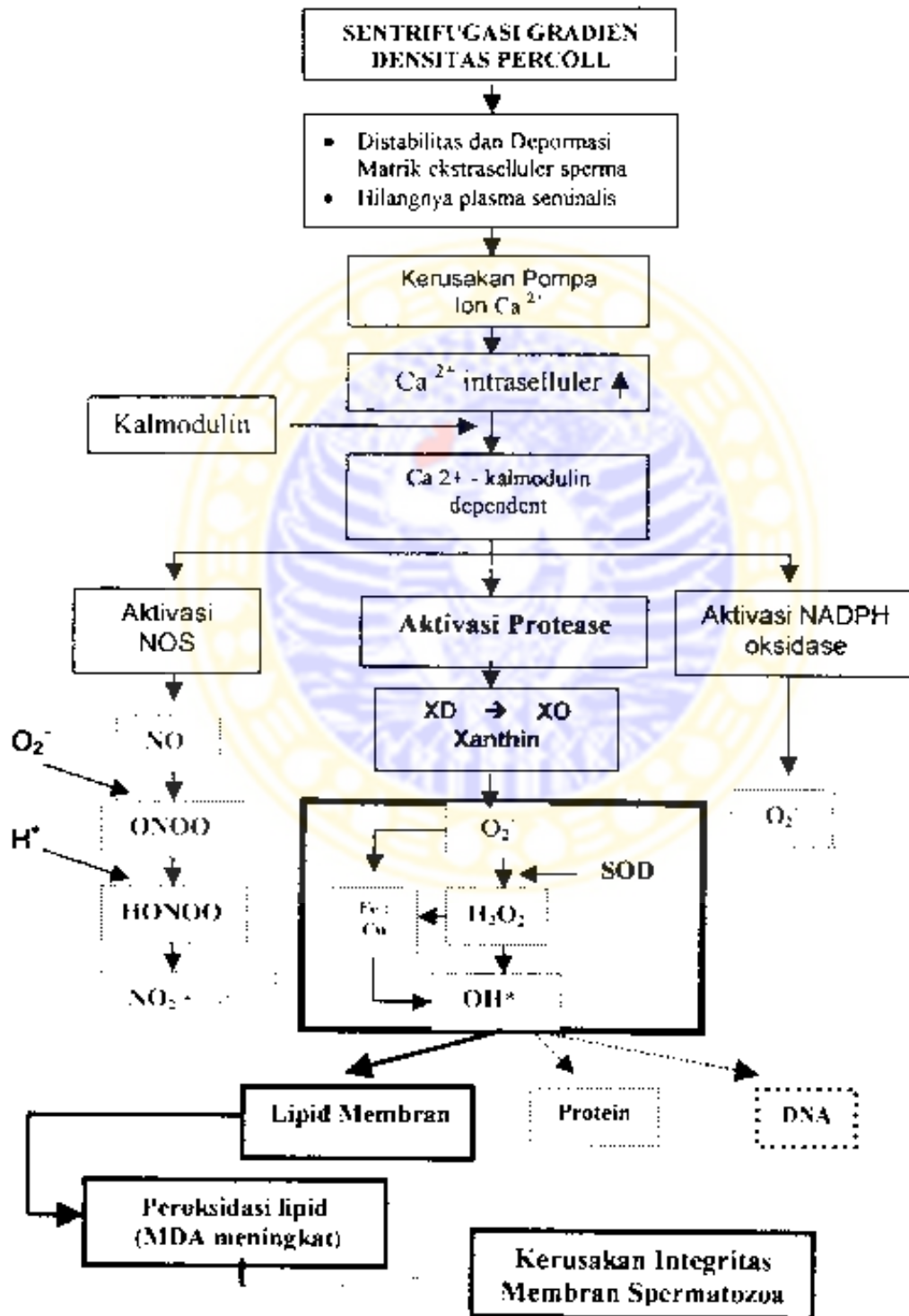
Peningkatan pembentukan ROS dikorelasikan dengan penurunan motilitas sperma (Agarwal *et al.*, 1994^a). Hubungan antara ROS dan penurunan motilitas mungkin disebabkan oleh banyak peristiwa yang menyebabkan penurunan fosforilasi protein axonemal dan immobilisasi spermatozoa, yang keduanya dikaitkan dengan reduksi fluiditas membran yang diperlukan untuk fusi spermatozoa-oosit (de Lamirande and Gagnon, 1995). Hipotesis lain mengatakan bahwa H₂O₂ dapat menyebar melintasi membran-membran ke sel-sel dan menghambat aktivitas enzim-enzim seperti enzim *glukose-6-phosphat dehydrogenase* (G₆PD). Enzim ini

mengendalikan tingkat fluks/aliran glukosa melalui *hexose monophosphate shunt*, yang pada gilirannya mengendalikan ketersediaan *nicotinamida-adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) intraselular. Hal ini pada gilirannya dipakai sebagai sumber elektron oleh spermatozoa untuk mendorong timbulnya ROS oleh sistem enzim yang dikenal sebagai NADPH oksidase (Aitken *et al.*, 1997). Penghambatan G₆PD menyebabkan menurunnya ketersediaan NADPH dan menyebabkan turunnya akumulasi glutathione teroksidasi dan glutathione tereduksi secara bersamaan. Hal ini dapat mereduksi pertahanan antioksidan spermatozoa dan peroksidasi fosfolipid membran (Twigg *et al.*, 1998).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3. 1. Kerangka Konseptual Penelitian



Sentrifugasi gradien densitas percoll merupakan salah satu metode pemisahan spermatozoa yang dilakukan dengan cara pemutaran spermatozoa dalam tabung yang berisi medium percoll dalam berbagai tingkat densitas pada kecepatan dan waktu tertentu. Selain dapat memisahkan spermatozoa X dan spermatozoa Y, sentrifugasi gradien densitas percoll juga dapat menginduksi kerusakan integritas membran spermatozoa dan pembentukan senyawa oksigen reaktif pada spermatozoa (Iwazaki and Gagnon, 1992; Agarwal *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1999). Lama waktu sentrifugasi mempunyai peran lebih penting dalam menginduksi pembentuk ROS oleh spermatozoa yang dipisahkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll (Shakarriz *et al.*, 1995 dan Agarwall *et al.*, 2004)

Gesekan mekanik membran spermatozoa dengan partikel percoll atau dinding tabung selama proses sentrifugasi dapat menyebabkan deformasi matriks ekstraselluler dan perubahan sistem regulasi ion pada membran spermatozoa (Phelp *et al.* 1999). Keadaan ini menyebabkan transport ion Ca^{2+} ke dalam/keluar sel berjalan tidak normal, sehingga konsentrasi ion Ca^{2+} intraselluler menjadi meningkat (Susilawati, 2000). Peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} intraseller akan meningkatkan ikatan Ca^{2+} pada kalmodulin yang selanjutnya akan mengaktifasi Ca^{2+} kalmodulin dependent protein kinase yang penting untuk mengatur sintesa nitrit oksida sintetase (NOS) untuk membentuk NO (Halliwell and Gutteridge, 1999). Selanjutnya NO bereaksi dengan O_2^- membentuk NO_3^- , kemudian NO_3^- bereaksi dengan H^+ menghasilkan HNO_3 (asam peroksi nitrit) yang selanjutnya akan menghasilkan radikalhidroksil (OH^\cdot). Peningkatan ikatan Ca^{2+} dependen protein kinase juga mengaktifkan

sejumlah enzim-enzim NADPH oksidase pada membran untuk menghasilkan radikal superoksida anion (O_2^-) dan juga akan mengaktifkan enzim protease seperti *calpain* yang penting untuk merubah xanthin dehidrogenase menjadi xanthin oksidase sebagai sumber O_2 (Halliwell and Gutteridge, 1999). Dalam keadaan normal peningkatan O_2^- ini akan dinetralsir oleh enzim superoksida dismutase menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2), selanjutnya H_2O_2 oleh enzim katalase atau glutathion peroksidasase dinetralsir menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2). Namun bila enzim antioksidan pada spermatozoa rendah dan tidak mampu menetralsir peningkatan radikal superoksida anion ataupun H_2O_2 menjadi air, maka akan radikal superoksida anion yang terbentuk akan bereaksi dengan hydrogen peroksida dan bantuan indikator Fe^{2+} dan Cu^{2+} membentuk senyawa radikal hidroksil (OH^{\cdot}). Radikal hidroksil merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen yang reaktif dan mampu menyebabkan kerusakan pada membran, protein dan DNA (Gutteridge and Halliwell, 1999). Radikal hidroksil bila bereaksi dengan asam lemak poli tak jenuh pada membran spermatozoa akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Akhir dari peroksidasi lipid membran ini akan menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik terhadap sel termasuk senyawa *malondialdehyde* (MDA) yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan permeabilitas membran sel (Aitken, 1995), kerusakan protein dan DNA sehingga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa (Fraga *et al.*, 1996)

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, kajian teori dan kerangka konseptual penelitian, maka dapat diajukan beberapa hipotesis sebagai berikut;

1. Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat meningkatkan tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan profil lipid membran dan kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur
2. Ada perbedaan tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan profil lipid membran dan kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 menit. Tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan profil lipid membran dan kerusakan integritas membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi dari pada sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit
3. Tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid dan penurunan profil asam lemak membran berpengaruh terhadap tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah sentrifugasi gradien densitas percoll. Tingkat akumulasi produksi ROS berpengaruh secara positif terhadap tingkat peroksidasi lipid dan berpengaruh secara negatif terhadap penurunan profil lipid membran dan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa. Tingkat peroksidasi lipid

berpengaruh negatif terhadap penurunan profil lipid membran dan persentase MPU spermatozoa. Tingkat penurunan profil lipid berpengaruh secara positif terhadap persentase MPU spermatozoa. Makin tinggi akumulasi produksi ROS makin tinggi tingkat peroksidasi lipid dan profil lipid membran makin menurun serta persentase MPU makin menurun

4. Tingkat akumulasi produksi ROS berpengaruh secara langsung terhadap tingkat peroksidasi lipid dan penurunan profil lipid membran spermatozoa. Tingkat peroksidasi lipid dan penurunan profil lipid membran berpengaruh secara langsung terhadap persentase MPU spermatozoa. Jadi tingkat akumulasi produksi ROS spermatozoa berpengaruh terhadap persentase MPU spermatozoa secara tidak langsung, melalui peningkatan peroksidasi lipid dan penurunan profil lipid membran

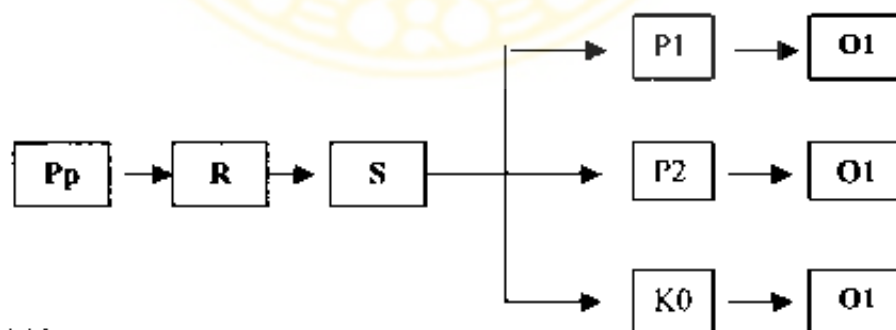
BAB 4

METODE PENELITIAN

4. 1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium (*experimental laboratoric*) menggunakan sejumlah sampel semen segar kerbau lumpur yang dipisahkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan *the pre test - post test controle group design* (Zainuddin, 1995). Dalam penelitian ini digunakan 3 kelompok sampel semen segar yaitu a) kelompok semen segar tanpa pemisahan b) kelompok semen segar hasil sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan c) kelompok semen segar hasil sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit. Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut;



Keterangan

Pp = Populasi Semen kerbau lumpur

R = Randomisasi

S = Sampel semen

P1 = Spermatozoa hasil sentrifugasi gradien densitas percoll kecepatan 850 x g rpm selama 5' dan diencerkan dg EBSS

P2 = Sentrifugasi Gradien densitas percoll kecepatan 850 x g rpm selama 10' dan diencerkan dg EBSS.

K0 = Spermatozoa hasil pengenceran tanpa sentrifugasi gradien densitas percoll

O1 = Variabel yang diukur (motilitas, MPU, kadar ROS, MDA; profil lipid membran)

4. 2. Populasi, Sampel dan Besar Sampel

4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah sejumlah semen segar berkualitas baik yang diperoleh dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan dari kerbau lumpur pejantan sehat yang berumur 3 – 4 tahun.

4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah hasil random dari sejumlah semen segar kerbau lumpur berkualitas baik. Pemilihan sampel semen yang berkualitas baik, didasarkan pada kriteria yang telah ditetapkan oleh Balai Inseminasi Buatan (BIB) Dirjen Peternakan yaitu persentase motilitas awal minimal 70 %; konsentrasi lebih dari 600 juta/ml; persentase spermatozoa hidup > 80 % dan spermatozoa abnormalitas < 20 %.

4.2.3. Besar Sampel Penelitian

Besar sampel dalam penelitian ini diperoleh dengan menggunakan rumus Higgins & Klinbaum (1985) sebagai berikut;

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot \sigma^2}{\sigma^2}$$

Keterangan:

n : Besar sampel

Z_{α} : Harga standar α 0,05 = 1,96

Z β : Harga standar β 0,10 = 1,28

Pada penelitian eksperimental nilai σ^2 / δ^2 adalah 1

Maka jumlah sample adalah;

$$n = (1,96 + 1,28)^2$$

$$n = 7,9 \rightarrow \text{dibulatkan jadi } 8$$

Jadi besar sampel (n) yang diperoleh menjadi 8 perkelompok perlakuan, dengan total sampel keseluruhan adalah 24 sampel.

4. 3. Variabel Penelitian

4. 3. 1. Identifikasi Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa variabel yaitu; a).

Variabel bebas, b) variabel tergantung dan c) variabel kendali.

1. **Variabel Bebas** meliputi sentrifugasi gradien densitas percoll.
2. **Variabel Tergantung** meliputi tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa
3. **Variabel Intervening** meliputi motilitas spermatozoa; akumulasi produksi ROS; kadar MDA spermatozoa dan profil asam lemak membran spermatozoa.
4. **Variabel Kendali** meliputi medium pengencer dan pencuci semen, kecepatan sentrifugasi, tingkat gradien densitas percoll, umur pejantan dan volume semen.

4. 3. 2. Definisi Operasional Variabel

- a. **Sentrifugasi Gradien densitas Percoll:** merupakan suatu metode pemisahan spermatozoa yang dilakukan dengan cara pemutaran spermatozoa dalam tabung khusus yang berisi bentukan kolom percoll dalam konsentrasi bertingkat pada kecepatan dan lama waktu tertentu. Kolom percoll yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari 5 tingkat densitas (1,034; 1,042; 1,052; 1,063; dan 1,070 g/ml) yang disusun secara berurutan dengan densitas yang paling tinggi pada lapisan paling bawah dan diikuti dengan densitas yang lebih rendah pada lapisan atas, dengan volume masing-masing densitas sebanyak 1 ml. Semen ditempatkan pada lapisan paling atas, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 850 x g dalam dua kelompok waktu tertentu.
- b. **Lama Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll:** adalah waktu yang digunakan untuk memisahkan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll. Lama waktu sentrifugasi yang digunakan pada penelitian ini adalah selama 5 menit (sebagai kelompok perlakuan satu = P1) dan sentrifugasi selama 10 menit (sebagai kelompok perlakuan dua = P2) serta tanpa perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi (sebagai kontrol = K0).

- c. **Akumulasi produksi ROS:** adalah sejumlah senyawa oksigen reaktif (yang diukur berdasarkan pada indikator H_2O_2) yang terakumulasi dalam suspensi spermatozoa. Pengamatan akumulasi produksi ROS diukur dengan metode *khemiluminisensi* menggunakan luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine dione*; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) sebagai probe dan *horse radish peroxidase* (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) sebagai pemicu pembentukan ROS. Nilai akumulasi produksi ROS spermatozoa dinyatakan dalam CPM/ 10^8 Spermatozoa (Aitken *et al.*, 1992 dan Ollero *et al.*, 2001).
- d. **Tingkat Peroksidasi lipid:** diukur berdasarkan peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) dalam suspensi semen. MDA merupakan senyawa yang dihasilkan dari peroksidasi lipid membran spermatozoa. Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan menggunakan metode *thiobarbiturat* (*Thyobarbiturat Acid/ TBA*) dan diperiksa absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 529 nm. Nilainya kadar MDA dinyatakan dalam nmol/ 10^8 Spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995).
- e. **Profil asam lemak membran Spermatozoa:** diukur berdasarkan pada indikator kadar asam lemak poli tak jenuh *decoxahexanoic acide* (DHA) membran spermatozoa.

Pengukuran kadar DHA dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography (GC) autosampler* (GS – HP 5890 A) dengan indikator asam lemak docosahexanoat standart (*docosahexanoic acid P. 8125, Sigma*). Nilai kadar DHA membran dinyatakan dalam $\mu\text{g/ml}/10^8$ spermatozoa atau $\text{nmol}/10^8$ spermatozoa (Kelso et al., 1997; Guzman et al., 2001).

- f. **Integritas Membran Spermatozoa** ditentukan berdasarkan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa yang diuji dengan menggunakan metode *Hypoosmotic Swelling Test (HOS-Test)* yaitu dengan cara memaparkan spermatozoa dalam larutan hypoosmotik selama 1 – 3 jam dan di amati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 X. Spermatozoa yang mempunyai integritas membran utuh ditandai dengan adanya pembengkakan kepala dan ekor yang berputar setelah dipaparkan dalam larutan hypoosmotik. Nilainya dinyatakan dalam persentase (Jayendra, 1990).
- g. **Motilitas Spermatozoa:** adaah gerakan maju kedepan (progresif) spermatozoa dalam medium EBSS + 5 % FBS setelah *swim up* selama 15 menit. Perkiraan motilitas spermatozoa adalah prosedur visual dan dinyatakan secara kooperatif tidak mutlak. Motilitas spermatozoa diketahui dengan cara menganalisa 10 – 15 μl sampel semen yang

diteteskan pada objek gelas. ditutup dengan cover gelas (20 x 20 mm) Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan menggunakan mikroskop biokuler dengan pembesaran 400 X per 100 sel spermatozoa dengan gerakan cepat dan maju lurus Gerakan spermatozoa dihitung secara skoring dari 0 sampai 100 % (Toelihere, 1985 dan BIB Singosari, 1994).

4. 4. Bahan dan Peralatan Penelitian

4.4.1. Bahan Penelitian

4.4.1.1. Bahan biologis

Bahan biologis yang digunakan dalam penelitian ini berupa sejumlah ejakulat semen segar kerbau lumpur yang diperoleh dengan cara penampungan langsung dari pejantan sehat. Semen yang digunakan harus memenuhi persyaratan motilitas individu di atas 70 %, abnormalitas kurang dari 20% dan konsentrasi di atas 600 juta sperma/ml .

4.4.1.2. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimiawi yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari:

a. Bahan-bahan untuk penampungan, pemisahan dan pemeriksaan kualitas spermatozoa

Medium Percoll (*Sigma*); Earle's Balanced Salt Solution /EBSS (*Sigma*), medium pencuci (*washing*) Spermatozoa: Phosphate Buffer Solution/PBS (*Sigma*); NaCl fisiologis (*Sigma*); Foetal Bovine Serum/BSA (*Sigma*) ;T.J Beker

(Sigma); Aquadest steril dan alkohol 70 %; Eosin-Negrosin (Sigma); Fruktosa (Sigma); ethanol 75 % dan 90 %, HCl pekat dan formalin 1 %; Vaseline dan sabun pencuci.

b. Bahan untuk pemeriksaan akumulasi ROS

Medium luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); Horse radish peroxidase (Sigma); DMSO (Merck); medium EBSS (Earle Balance Salt Solution, Sigma).

c. Bahan untuk pemeriksaan MDA

Trichloro Acetic Acid (TCA) (Merck). Hydrochloric Acid (HCl) (Merck). Aquades steril (Merck) dan Thiobarbiturate Acid (Sigma) dan MDA standart (Aldrich Chemicals Company, Inc.);

d. Bahan untuk pemeriksaan profil lipid

Chloroform (Merck); methanol (Merck); BF₃-metanol (Merck); n-hexane (Merck); asam asetat (Merck); diethyleter (Merck); Docosahexanoic acid standar P-8125 (Sigma).

4. 4. 2. Peralatan Penelitian

4.4.2.1. Peralatan untuk Penampungan Semen,

Vagina Buatan lengkap dengan sarungnya; tabung reaksi berskala (15 ml), thermos air panas, Vaseline dan sabun pembersih.

4.4.2.2. Peralatan untuk Pemisahan, Pencucian dan Pemeriksaan Kualitas Spermatozoa

Tabung reaksi berskala; tabung centrifuge; Incubator CO₂ (*Compact CO₂ Series 5000, USA*); Centrifugator (*EBA-3S, Hettich*); Laminar Flow (*Speg Air Tech, PRC*); Hot plate-magnetic stirer (*Labinco, Holland*); Refrigerator (*Sharp, Japan*); Timbangan Listrik (*Electronic Balance, Chyo*); Waterbath (*Memmerf*); PH meter (*Hanna, Singapore*); Yellow Tip; Haemocytometer Thoma; Mikro pipet (0,1 – 20 µl, 20 µl – 50 µl; 50 – 200 µl dan 200 µl – 1000 µl); Parafilm (*National Can, Amerika*); Rak Tabung; Kertas Tissue; Disposable spuit 1 – 10 CC (*BBD*); Disposable pipet pasteur (*Nipro*) dan Labu ukur; objek gelas; Cover gelas; tabung affendorf; Vortex mixer (*Thermolyne, USA*); aluminium foil; Mikroskop fase kontras (*Meiji*); Mikroskop inverted (*Olympus, Japan*).

4.4.2.3. Peralatan pemeriksaan akumulasi produksi ROS spermatozoa

Berthold luminometer (*Autolumat LB 953; Wallac Inc., Gaithersburg, MD, USA*) lengkap dengan tabungnya; Vortex mixer (*Thermolyne, USA*); Mikro pipet (0,1–20µl, 50 – 200 µl dan 200 µl – 1000 µl).

4.4.2.4. Peralatan pemeriksaan kadar MDA spermatozoa

Sentrifuge (*Heræus Sepatech Labofuge 200*); Spectrophotometer (*Hitachi U-2000, double beam*); Waterbath (*Memmerf*); PH meter (*Hanna, Singapore*); Vortex mixer (*Thermolyne, USA*).

4.4.2.5. Peralatan pemeriksaan kadar DHA membran spermatozoa

Peralatan yang digunakan untuk pemeriksaan asam lemak poli tak jenuh DHA spermatozoa dilakukan menggunakan *Chromatography* (GS – HP 5890 A) lengkap dengan monitor.

4. 5. Tempat dan Waktu Penelitian:

Penelitian ini dilakukan pada tempat yang berbeda yaitu 1). Pemisahan spermatozoa dan pemeriksaan kualitas spermatozoa dilakukan di Lab. Kebidanan FKH Unair. 2) Pemeriksaan ROS dilakukan Lab. Makmal R.S.U.D. Dr.Soetomo – Surabaya 3). Pemeriksaan kadar MDA dilakukan di Lab. Biomedik Fakultas Kedokteran UNIBRAW Malang 4) Pemeriksaan asam lemak DHA dilakukan di Lab. Kimia Organik Fak. MIFA- UGM Yogyakarta.

4. 6. Prosedur Pengumpulan Data

Untuk menguji hipotesis yang diajukan, penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap penelitian.

4.6.1. Penampungan Semen

Sampel semen yang akan digunakan untuk penelitian ini, diperoleh dari kerbau lumpur jantan sehat yang berumur 3.5 – 4 tahun, dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan. Penampungan semen dilakukan pada pagi hari jam 8.00 – 9.00 WIB sebanyak 1 kali dalam seminggu. Prosedur penampungan dilakukan berdasarkan metode yang biasa dilakukan pada Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari Malang.



Gambar 4.1. Persiapan penampungan Semen Kerbau Lumpur Menggunakan Vagina Buatan

Segera setelah penampungan semen, dilakukan pemeriksaan kualitas spermatozoa secara makroskopis (volume, warna, konsistensi, bau dan pH) dan mikroskopis (konsentrasi, motilitas, viabilitas, abnormalitas). Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa $> 600 \times 10^6$ /ml dan motilitas progresif > 70 %, abnormalitas < 20 % digunakan sebagai sampel.

Setelah penilaian, sampel semen diencerkan dengan medium EBSS yang dilengkapi dengan 5 % BSA dengan perbandingan 1 : 2. Kemudian suspensi semen tersebut dibagi menjadi 3 bagian dan masukan dalam tabung sesuai dengan kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan 1 (sampel semen yang sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit), kelompok perlakuan 2 (sampel semen yang sentrifugasi gradien

densitas percoll selama 10 menit) dan kelompok kontrol (sampel semen yang tidak disentrifugasi).

4.6.2. Pemisahan Spermatozoa dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

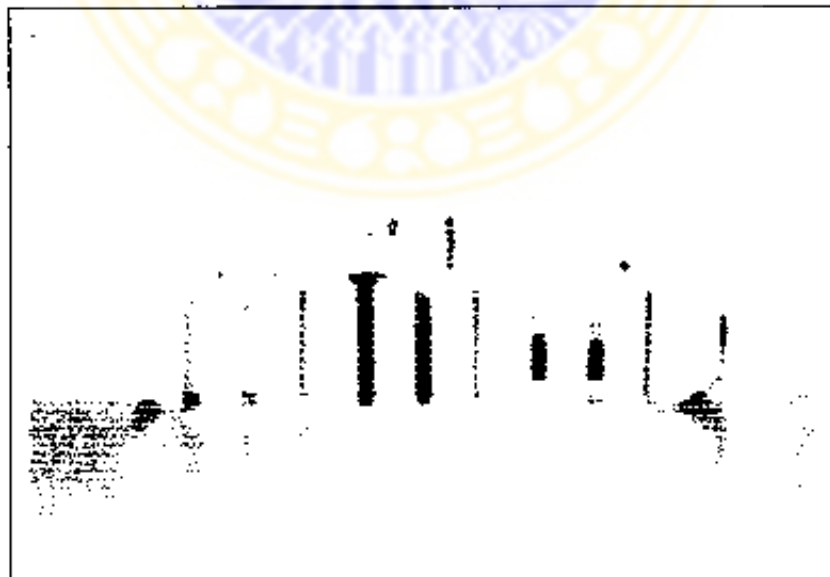
a. Pembuatan Gradien Densitas Percoll

Gradien densitas percoll yang digunakan adalah 5 tingkat (1,034; 1,042; 1,052; 1,063; dan 1,070 g/ml) yang diperoleh dari pengenceran percoll dengan 5 % FBS dalam medium Earle' Balance Salt Solution (EBSS) menjadi 20,0 %; 30,0 %; 40,0 %; 50,0 % dan 60,0 %. Kemudian larutan masing-masing densitas dimasukkan dalam tabung secara berurutan dari densitas tertinggi pada lapisan bawah dan diikuti densitas terendah pada lapisan atas, masing-masing densitas volumenya sebanyak 1,0 ml.

b. Pelaksanaan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Sebanyak 1,0 ml suspensi semen yang sudah diencerkan dimasukkan dalam tabung yang berisi medium gradien densitas percoll dalam berbagai tingkat densitas, selanjutnya sentrifugasi pada kecepatan 850 x G selama 5 menit dan 10 menit sesuai dengan perlakuan penelitian pada temperatur kamar. Setelah sentrifugasi didapatkan 6 tingkat lapisan, yang terdiri dari 1 bagian paling atas plasma seminalis dan 5 bagian densitas percoll. Kemudian duapertiga bagian atas dibuang, sedangkan sepertiga suspensi bagian bawah (2.0 ml) diambil untuk pemeriksaan lebih

lanjut. Suspensi spermatozoa selanjutnya dicuci dengan cara penambahan 3 ml EBSS, lalu sentrifugasi lagi dengan kecepatan 500 x G selama 5 menit. Supernatannya dibuang dan pellet yang didapat diresuspensi kembali dengan 3 ml medium EBSS melalui dinding tabung. Khusus untuk kelompok kontrol sebanyak 1 ml suspensi semen segar yang sudah diencerkan ditambahkan lagi dengan medium EBSS sampai volume 3 ml. Kemudian masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol di inkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37 °C pada kelembaban 95 % selama 15 menit, dan ukur persentase motilitas, integritas membran plasma utuh (MPU), konsentrasi spermatozoa, akumulasi produksi ROS, kadar MDA dan DHA spermatozoa. Gambaran semen sebelum dan sesudah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Tabung berisi suspensi sperma sebelum dan setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll

4.6.3. Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa terdiri dari pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif. Sebanyak sekitar 10 μ l suspensi semen pada tiap kelompok perlakuan ditetaskan pada objek glass yang terdapat lekukan ditengahnya, kemudian ditutup dengan cover glass dan amati motilitas spermatozoa dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X. Pemeriksaan motilitas spermatozoa kuantitatif ditentukan secara objektif dengan tingkatan pergerakan progresif kedepan spermatozoa. Motilitas spermatozoa dibagi empat kriteria yaitu; pergerakan yang sangat baik (bergerak cepat kedepan) diberi kode (a) pergerakan yang baik (bergerak maju kedepan) diberi kode (b); pergerakan spermatozoa ditempat atau berputar (c) dan spermatozoa tidak bergerak (d). Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa motil dan tidak motil beberapa lapangan pandang yang terpisah secara acak. Persentase pergerakan spermatozoa dihitung dengan rata-rata persentase motilitas untuk semua lapangan pandang yang dihitung. Persentase spermatozoa motil yang ditampilkan pada penelitian ini hanya spermatozoa yang bergerak cepat kedepan (a) dan gerakan kedepan (b) sampai sebanyak 100 sampai 200 ekor.

4.6.4. Pemeriksaan Konsentrasi Spermatozoa

Pemhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan dengan menggunakan kamar hitung thoma dan pipet haemocytometer. Suspensi spermatozoa dipipet dengan menggunakan pipet heamositometer sampai angka 1 dan kemudian dipipet lagi dengan larutan HCl sampai angka 101. Selanjutnya pipet dikocok membentuk angka delapan selama beberapa menit. Ujung pipet dibersihkan dengan kertas tisu dan kemudian teteskan 2 – 3 tetes pada kamar hitung thoma dan tutup dengan *cover glass*. Sel spermatozoa dihitung pada 5 kotak besar atau 80 kotak kecil secara acak. Kemudian jumlah spermatozoa didapat pada ke 80 kotak kecil dikalikan dengan 10.000 dan dikonversikan kedalam konsentrasi (10^9 spermatozoa / ml).

4.6.5. Pemeriksaan Integritas Membran Plasma Utuh Spermatozoa

Pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa dilakukan berdasarkan uji pembengkakan atau *hyposmotic swelling test* (HOST) yang dikembangkan oleh Jayendra *et al.*, (1984). Sebanyak 0,1 ml suspensi spermatozoa hasil pemisahan di tambahkan dalam 9,9 ml larutan hyposmotik 0,032 M (yang dibuat dari 7,35 g Natrium sitrat $2H_2O$, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades), dan inkubasikan selama 1 jam didalam inkubator CO_2 pada suhu $37^\circ C$. Selanjutnya dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan satu tetes larutan diatas dengan 1

tetes eosin negrosin. Kemudian diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 X. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma utuh terlihat adanya pembengkakan kepala yang diikuti ekor berputar dengan pacaran warna terang, sedangkan spermatozoa yang membran plasma sudah rusak ditandai dengan tidak ada pembengkakan kepala dengan ekor yang lurus.

4.6.6. Pemeriksaan Akumulasi ROS Spermatozoa

Akumulasi ROS spermatozoa diukur dengan menggunakan uji chemiluminescence konvensional, menggunakan luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) sebagai probe dan *horse radish peroxidase* untuk pemicu sintesis *hydrogen peroxide* (Aitken *et al.*, 1994 dan Ollero *et al.*, 2001).

Sebanyak 400 μ l suspensi spermatozoa dari masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan, ditambahkan dengan 4 μ l larutan luminol (25 mM luminol dalam *dimethylsulphoxide* /DMSO dengan konsentrasi akhir 250 μ M) dan 8 μ l larutan *horseradish peroksidase* (2 mg/ml dalam larutan buffer fosfat), selanjutnya divortek selama 30 detik. Kemudian appendorf yang berisi dimasukkan dalam tabung khusus dan diamati khemiluminisensinya selama satu menit dengan menggunakan *Berthold luminometer* (Autolumat LB 953; Wallac Inc., Gaithersburg, MD, USA). Nilai ROS diekspresikan

sebagai 10^6 photon yang dihitung per menit (CPM) per 1×10^8 spermatozoa.

4.6.7. Pemeriksaan Kadar MDA (*malondialdehyde*) Spermatozoa.

Pemeriksaan kadar MDA pada penelitian ini dilakukan menggunakan modifikasi metode test *Thiobarbiturat Acid* (TBA) yang dikembangkan oleh Alvarez and Storey (1995).

Sebanyak 100 μ l suspensi spermatozoa dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dipisahkan dari proteinnya dengan cara penambahan 100 μ l asam trikloroasetat 20 % dan vortex selama 30 detik, kemudian tambahkan dengan 250 μ l HCL 1N, 100 μ l natrium thiobarbiturat 1 % dan aquadest sampai volume akhir menjadi 1 ml (450 μ l), selanjutnya dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100 °C selama 20 menit. Kemudian sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Sebanyak 800 μ l supernatannya di masukan dalam tabung lain dan tambahkan dengan aquades sampai volume akhir 2,0 ml. Serapan warnanya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 529 nm. Penilaian kadar MDA dilakukan dengan cara mengkomversikan nilai hasil pengukuran absorbansi dengan nilai kurva baku standar MDA murni dalam berbagai konsentrasi. Selanjutnya nilai hasil perkalian pada kurva standar baku, selanjutnya nilai yang didapat dikalikan lagi dengan faktor pengenceran yang digunakan. Kadar MDA diukur berdasarkan jumlah μ g atau nmol MDA pada setiap ml

suspensi spermatozoa atau jumlah konsentrasi spermatozoa per ml. Teknik perhitungan kadar MDA spermatozoa terlihat pada Lampiran 6.

4.6.8. Pemeriksaan profil Asam lemak DHA membran Spermatozoa

Sebanyak 1,0 ml suspensi spermatozoa dari masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol dicuci sebanyak dua kali dengan tiga ml larutan EBSS (*Eare's Balanced Salt Solution*) melalui sentrifugasi kecepatan 500 x g selama lima menit pada suhu kamar. Pellet yang didapat selanjutnya diresuspensi dengan satu ml EBSS dan hitung konsentrasi spermatozoa. Selanjutnya suspensi spermatozoa tersebut disentrifugasi lagi dengan kecepatan 500 x g selama tiga menit, kemudian buang supernatannya. Pellet yang tersisa diekstraksi lipidnya dengan cara menambahkan 3 ml larutan kloroform : metanol (1:2, v/v) dan sentrifugasi dengan kecepatan 1200 x g selama tiga menit. Selanjutnya fase cairnya diaspirasi dan saring dengan kertas whatman melalui corong untuk memisahkan padatnya dengan cairannya, lalu masukkan kedalam tabung khusus. Kemudian fase cair yang didapat dikeringkan dengan uap nitrogen mengalir. Bahagian yang tersisa atau residu merupakan lipid spermatozoa dan siap untuk pemeriksaan lebih lanjut.

Residu lipid yang diperoleh diesterifikasi dengan cara menambahkan larutan boron trifluorida (BF₃) methanol 15 %

sebanyak 0,5 ml, divortek selama 1 menit lalu panaskan dalam *water bath* pada suhu 80 °C selama 30 menit sambil digoyang-goyang. Kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan n-hexane, divortek selama 30 detik dan biarkan sampai terpisah menjadi dua bagian. Kemudian derivat metil ester asam lemak bagian atas diambil sebanyak 1 µl dengan menggunakan syringe dan suntikan pada injektor *Gas Chromatography Hewlett Packard 5890 A* dengan detektor FID, yang telah dikondisikan (suhu injektor 250 °C, suhu kolom 200 °C dan suhu detektor 250 °C), dan gas pembawa N₂ kecepatan 40 ml/menit dengan bahan bakar H₂ dan tekanan udara 1 kg/cm². Puncak methyl ester asam lemak DHA sampel diidentifikasi dengan perbandingan waktu retensi dari DHA standart dan dikuantifikasi dengan menggunakan konsntas DHA standar. Kadar asam lemak DHA dihitung dengan perbandingan luas area puncak asam lemak DHA sampel dibagi dengan luas areal puncak DHA standart internal dikali dengan jumlah kadar DHA standart (25 mg/1 ml). Selanjutnya untuk mendapatkan kadar DHA sampel per ml spermatozoa, maka kadar DHA yang didapat dikalikan lagi dengan faktor pengencer yang digunakan.

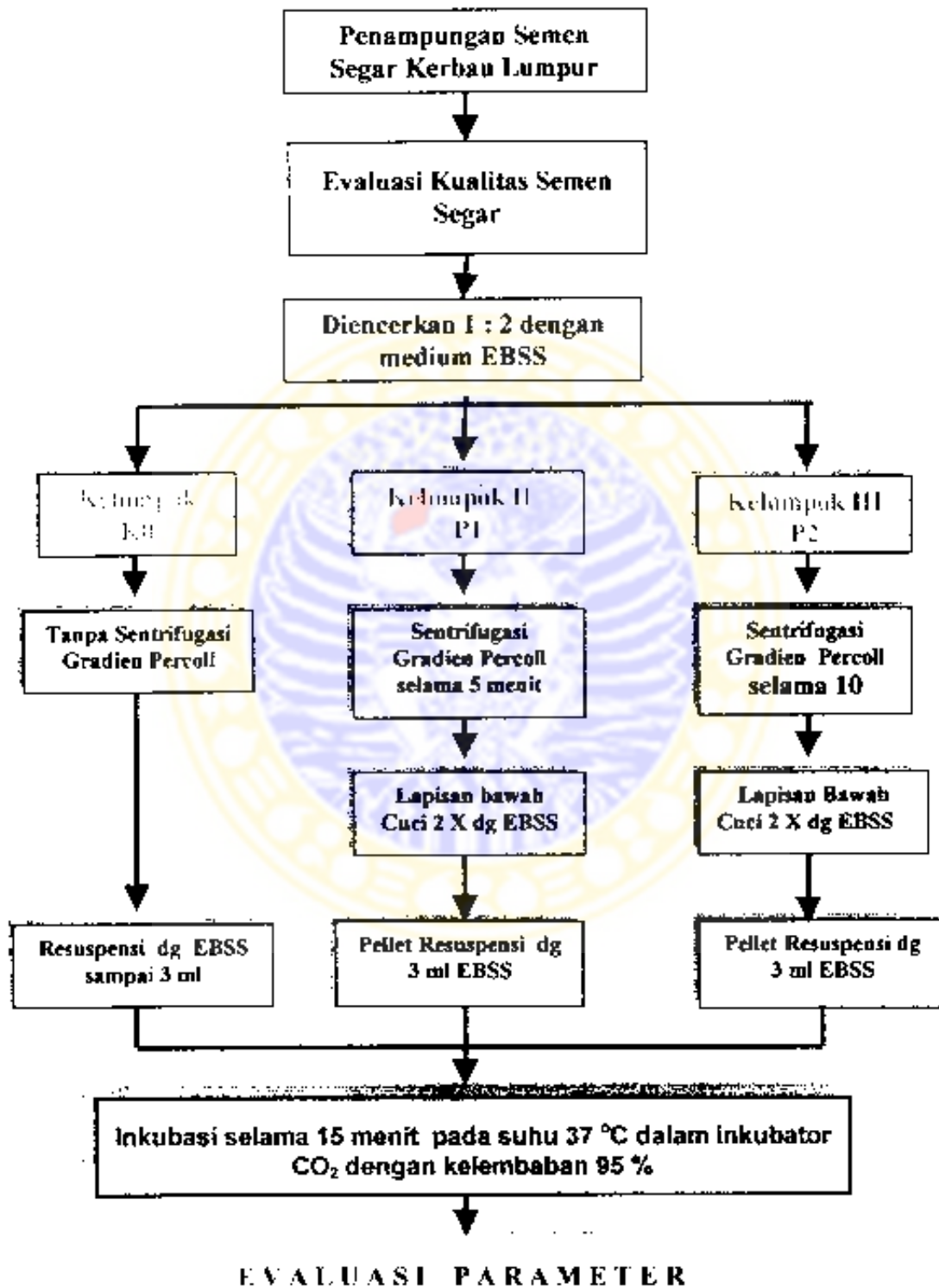
$$\text{Konst DHA } \left\{ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right\} = \frac{\text{Luas Areal DHA sampel}}{\text{Luas Areal DHA standart}} \times \text{konst DHA standart}$$

Kadar DHA sp/ml = nilai konst DHA x faktor pengenceran.

4.7. Analisis Data

Untuk mendeteksi distribusi data secara normal, data yang didapat terlebih dahulu diuji dengan *test Kolmogorov-Smirnov*. Sedangkan untuk mengetahui kehomogenan data semua sampel awal diuji homogenitas dengan *Levene's Test*. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap semua variabel spermatozoa pada dilakukan dengan uji Anova satu arah untuk data yang berdistribusi normal. Bila terdapat perbedaan antar perlakuan, maka data selanjutnya dianalisis dengan uji LSD (Steel and Torrie, 1990)..

Untuk melihat pengaruh akumulasi ROS, kadar MDA dan profil asam lemak membran terhadap integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dilakukan dengan uji regresi sederhana, sedangkan menentukan jalur pengaruh akumulasi ROS, kadar MDA dan profil asam lemak membran terhadap integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dilakukan dengan analisis jalur (*part analysis*).

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5. 1. Data Kualitas Semen Segar Kerbau Lumpur

Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen segar untuk bisa diperiksa lebih lanjut dalam proses pemisahan spermatozoa adalah hasil penitain kualitas semen segar sesaat setelah penampungan. Rata-rata kualitas semen segar kerbau lumpur yang digunakan pada penelitian ini tertera pada tabel 5.1

Tabel 5.1. Rataan (\pm SD) kualitas semen segar kerbau lumpur yang digunakan dalam penelitian

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	2,18 \pm 0,47
Warna	Putih susu
Konsistensi	Agak Kental s/d kental
Derajat Keasaman (pH)	6,75 \pm 0,12
Gerakan Massa	++ /+++
Konsentrasi (10^6 /ml)	1,128.00 \pm 189,11
Motilitas (%)	76,43 \pm 3,50
Abnormalitas (%)	12,34 \pm 4,12
Spermatozoa Hidup (%)	86,76 \pm 2,60
Membran Plasma utuh (%)	82,55 \pm 3,90

Keterangan : +++ (sangat baik /densum) dan ++ (baik/ semi densum)

Berdasarkan hasil evaluasi kualitas semen segar di atas, dapat disimpulkan bahwa semen segar kerbau lumpur yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kategori baik dan layak untuk digunakan untuk proses lebih lanjut seperti pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.

5. 2. Data Diskriptif Variabel Penelitian

5.2.1. Persentase Motilitas Spermatozoa

Rerata persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur yang pada kelompok kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata dan simpangan baku persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

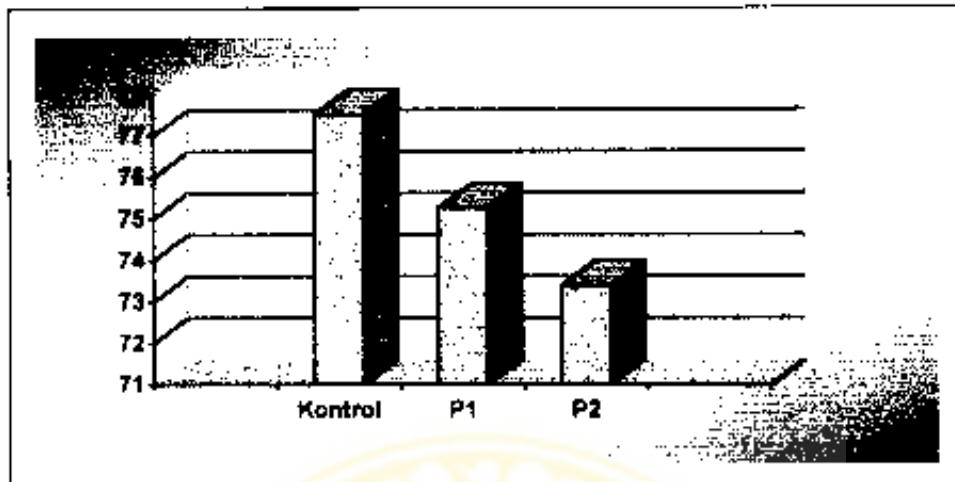
Variabel	Persentase Motilitas Spermatozoa	
	Rerata	SB
KO	77,50	1,85
P1	75,25	2,12
P2	73,38	2,45

Ket: KO : Kontrol (tanpa sentrifugasi gradien densitas percoll)

P1: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit

P2: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit

Tabel 5.2. di atas memmplihatkan bahwa persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll menurun pada kedua kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll. Rerata persentase motilitas spermatozoa yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Secara histogram rerata persentase MPU spermatozoa kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5. 1. Histogram persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

5.2.2. Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa

Rerata persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur yang diamati dengan metode hypoosmotic swelling test (HOS-Test) pada kelompok kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Rerata dan simpangan baku persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

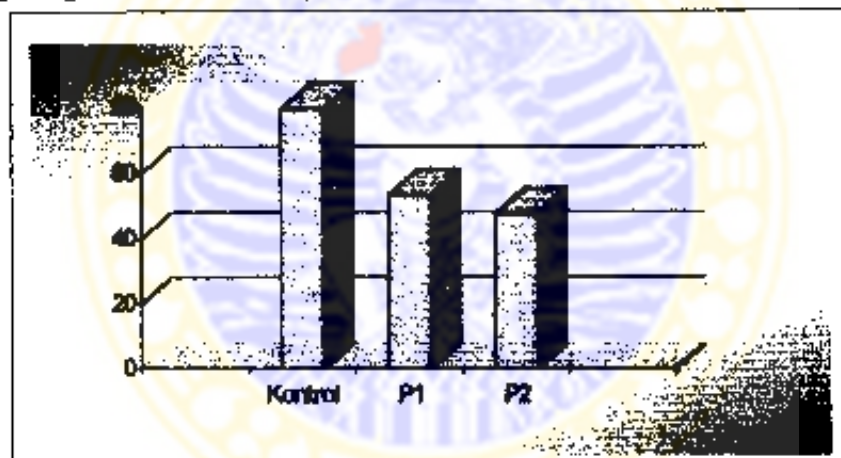
Variabel	Persentase MPU Spermatozoa	
	Rerata	SB
KO	79,50	3,21
P1	53,25	5,15
P2	47,50	4,84

Ket: KO : Kontrol (tanpa sentrifugasi gradien densitas percoll)

P1: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit

P2: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit

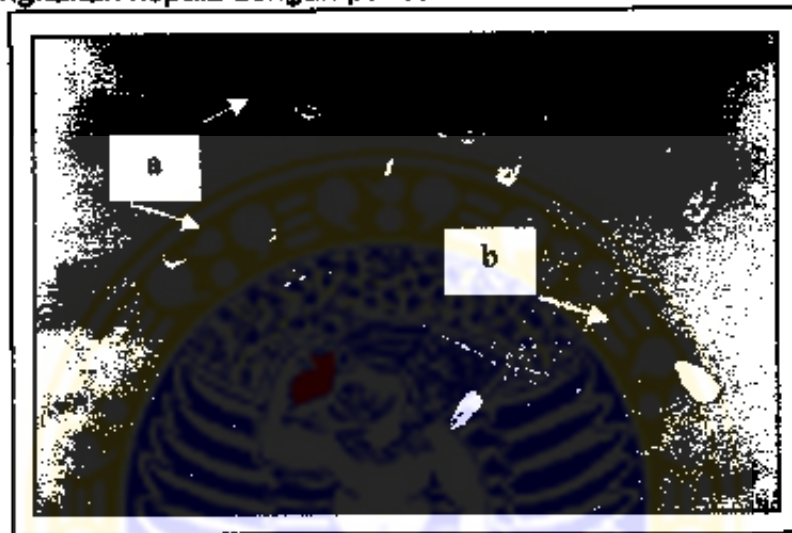
Tabel 5.3. di atas memmplihatkan bahwa persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll menurun pada kedua kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll. Rerata penurunan persentase MPU spermatozoa yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Secara histogram rerata persentase MPU spermatozoa kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat dilihat pada Gambar 5 2



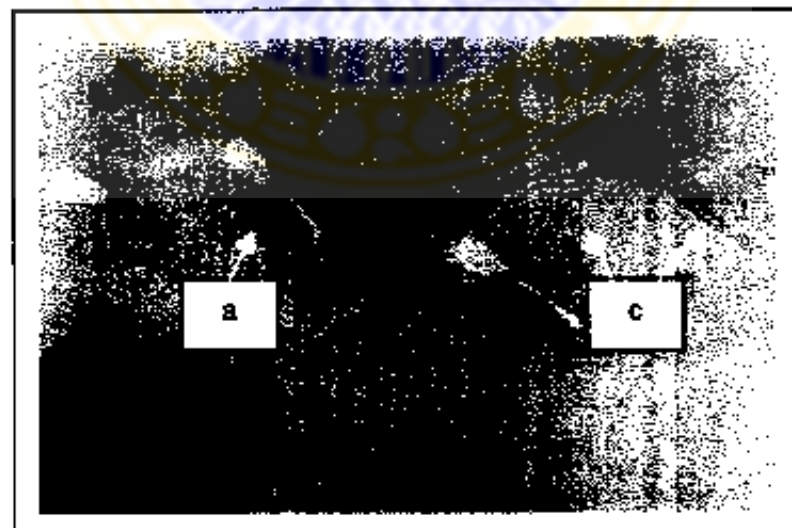
Gambar 5.2. Histogram persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Gambaran integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa yang dilakukan dengan menggunakan metode *hypoosmotik swelling test* dan pewarnaan eosin negrosin yang diamati dengan mikroskop cahaya terlihat pada pada Gambar 5.3 dan 5.4 Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma utuh dan hidup ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti ekor berputar dengan pacaran warna

terang. Spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak dan hidup ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna terang. Sedangkan spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak dan mati ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna merah.

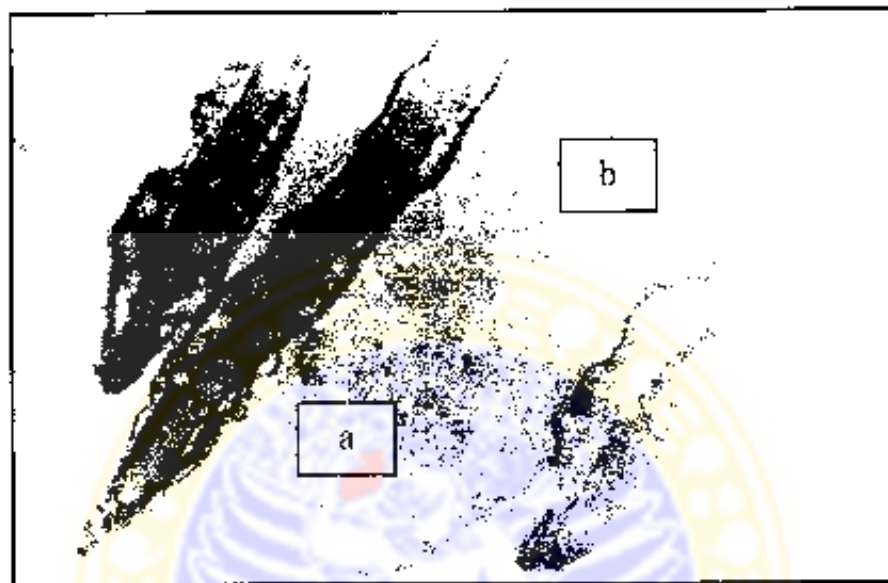


Gambar 5.3 Integritas membran plasma spermatozoa kerbau lumpur kontrol yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X; a) spermatozoa dengan membran plasma utuh b) spermatozoa dengan membran plasma rusak



Gambar 5.4 Integritas membran plasma spermatozoa kerbau lumpur setelah sentrifugasi gradien densitas percoll yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X; a) spermatozoa hidup dengan membran plasma utuh b) spermatozoa mati dengan membran plasma rusak

Sedangkan gambaran ultrastruktur spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll yang diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi terlihat pada Gambar 5.5



Gambar 5.5. Gambaran morfologi potongan melintang kepala spermatozoa kerbau lumpur yang diamati dengan Mikroskop Elektron Transmisi pembesaran 15.000 X a). Spermatozoa dengan membran akrosom yang utuh; b). spermatozoa dengan membran akrosom yang rusak

Gambar 5.5 menunjukkan bahwa spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat adanya kerusakan ultrastruktur membran membran plasma yang ditandai dengan adanya penggelembungan membran plasma sepanjang ekor dan membran tampak sobek serta terdapat bayangan hitam diantara kepala dengan leher spermatozoa. Sedangkan spermatozoa yang tidak mengalami kerusakan membran ditandai dengan tidak adanya penggelembungan membran plasma spermatozoa.

5.2.4. Akumulasi produksi ROS Spermatozoa Kerbau lumpur

Rerata akumulasi produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll yang diamati dengan metode khemiluminisensi dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Rataan dan simpangan baku akumulasi produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

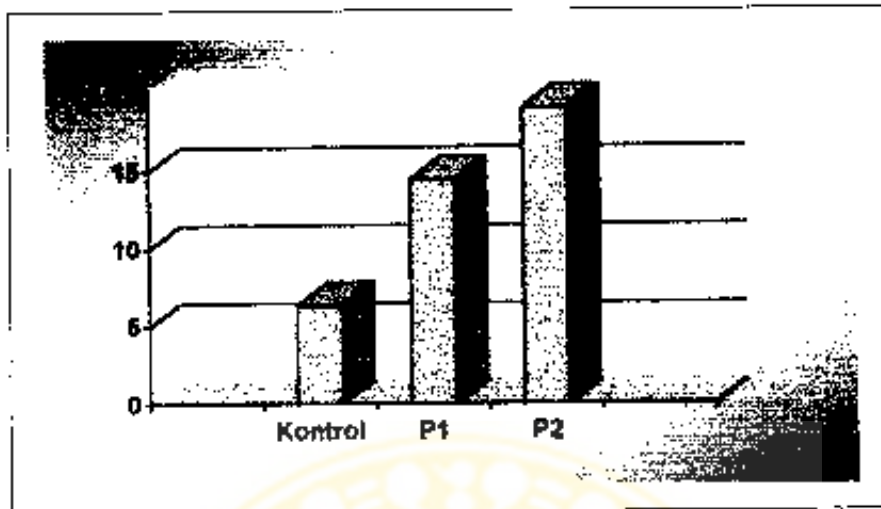
Perlakuan	Akumulasi produksi ROS spermatozoa (CPM/ml/10 ⁴ sp)	
	Rerata	Simpangan Baku
K0	6,34	1,75
P1	14,41	5,61
P2	18,98	11,11

Ket: K0 : Kontrol (tanpa sentrifugasi gradien densitas percoll)

P1: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit

P2: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit

Tabel 5.4 di atas memperlihatkan bahwa akumulasi produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat pada kedua kelompok lama waktu sentrifugasi. Rerata akumulasi produksi ROS yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit meningkat lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Secara histogram rerata akumulasi produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat pada Gambar 5.6.



Gambar 5. 6. Histogram akumulasi produksi ROS spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

5.2.4. Kadar Molandioldehide (MDA) Spermatozoa Kerbau lumpur

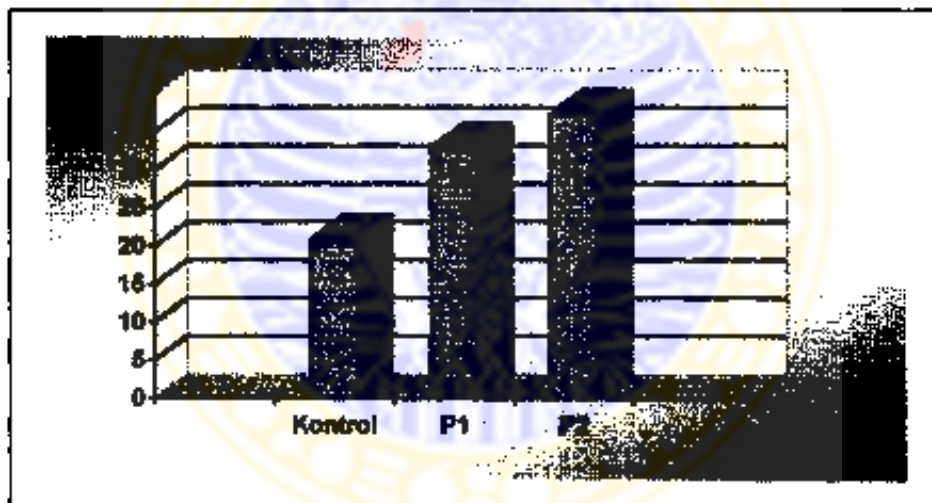
Hasil pengamatan kadar molandioldehide (MDA) dalam suspensi spermatozoa yang diamati dengan metode *thiobarbituric acid* (TBA) test pada kelompok kontrol dan perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat pada Tabel 5.5

Tabel 5.5. Rataan dan simpangan baku kadar MDA spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Perlakuan	Kadar MDA ($\text{nmol} / 10^6$ spermatozoa)	
	Rerata	Simpangan baku
K0	20,87	10,32
P1	32,93	11,36
P2	37,29	09,56

Ket: K0: Kontrol (tanpa sentrifugasi gradien densitas percoll)
 P1: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit
 P2: Perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit

Tabel 5.5 di atas memperlihatkan bahwa kadar MDA spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat pada kedua kelompok lama waktu sentrifugasi. Rerata kadar MDA yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit meningkat lebih tinggi dari pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Secara histogram rerata kadar MDA spermatozoa kontrol dan kedua kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat dilihat pada Gambar 5.7



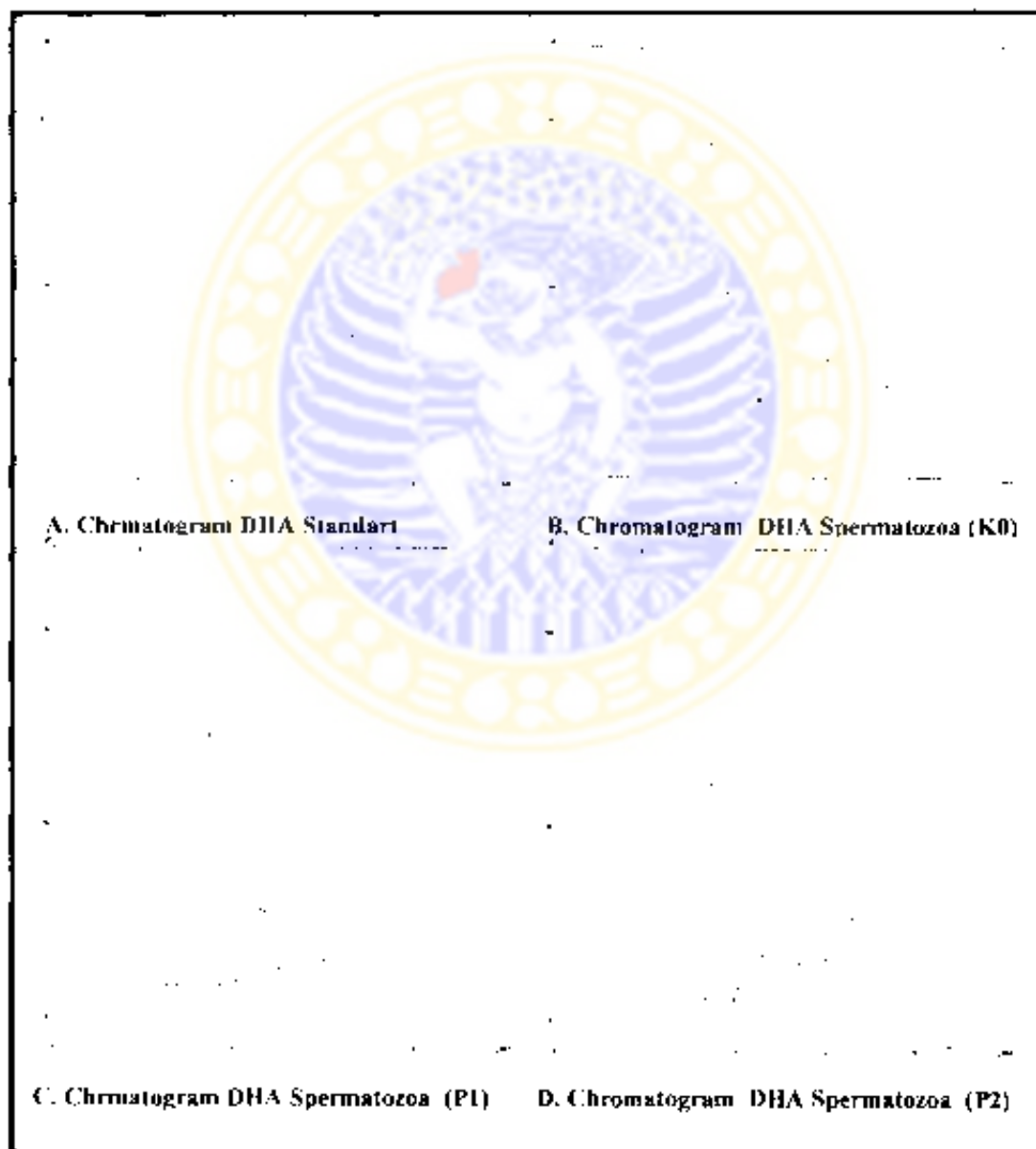
Gambar 5.7 Histogram kadar MDA spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

5.2.5. Profil Asam Lemak Membran Spermatozoa Kerbau lumpur

Perubahan profil asam lemak membran spermatozoa yang diamati pada penelitian adalah kadar asam lemak poli tak jenuh *decoxahexanoic acid* (DHA). Pengamatan kadar asam lemak DHA dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) dengan menggunakan indikator asam lemak DHA standar (*ocosahexanoic acid P. 8125, Sigma*).

Hasil analisis kadar asam lemak DHA membran spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll yang diamati dengan menggunakan *Gas Chromatography* dan chromatogramnya terlihat pada Gambar 5.8. sebagai berikut;

Gambar 5.8. Prin out Kromatogram asam lemak membran spermatozoa kerbau lumpur dengan menggunakan Gas Kromatografy

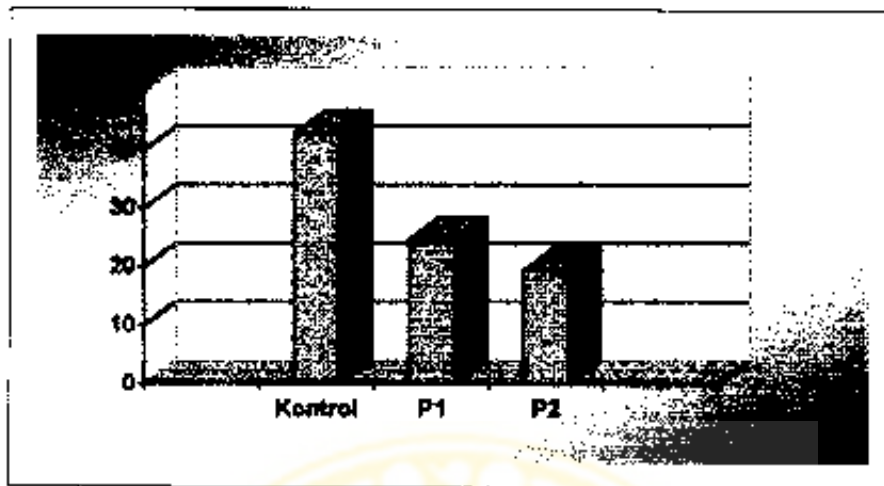


Pada kromatogram diatas puncak DHA terlihat pada menit ke 16 dengan nilai rerata kadar DHA membran spermatozoa pada ketiga kelompok perlakuan terlihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6. Rerata dan simpangan baku kadar DHA membran spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Perlakuan	Kadar DHA membran spermatozoa (ug/10 ⁶ spermatozoa)	
	Rerata	S. Baku
K0	42,81	6,76
P1	24,57	7,09
P2	19,26	6,68

Tabel 5.6 di atas memperlihatkan bahwa kadar DHA membran spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll menurun pada kedua kelompok lama waktu sentrifugasi. Kadar DHA membran spermatozoa yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 menit lebih rendah daripada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Secara histogram rerata kadar DHA spermatozoa kontrol dengan kedua kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat dilihat pada Gambar 5.9



Gambar 5.9. Histogram kadar DHA spermatozoa kerbau lumpur kelompok kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

5.3. Hasil Analisis Data Penelitian

Beberapa pengujian statistik parametrik menghendaki pemenuhan persyaratan pengujian untuk validitas hasil analisis. Prasyarat tersebut berupa uji normalitas dan kesamaan varian antar kelompok dengan uji homogenitas.

5.3.1. Uji Normalitas Distribusi Data Penelitian

Hasil pengujian normalitas distribusi data dengan menggunakan uji statistik *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* terlihat pada Tabel 5.7,

Tabel 5.7. Hasil uji Normalitas *Kolmogorov-Smirnov* data Variable

Variable	Uji Statistik	Statistik	P	Ket
Motilitas	Kolmogorov Smirnov	0,544	0,928	Normal
MPU	Kolmogorov Smirnov	0,939	0,342	Normal
ROS	Kolmogorov Smirnov	0,976	0,296	Normal
MDA	Kolmogorov Smirnov	0,407	0,996	Normal
DHA	Kolmogorov Smirnov	0,629	0,823	Normal

Dari hasil pengujian normalitas distribusi data dengan menggunakan uji statistik *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* di atas menunjukkan bahwa motilitas, persentase MPU, akumulasi produksi ROS, kadar MDA dan kadar DHA membran spermatozoa berdistribusi normal, maka untuk melihat perbedaan antar perlakuan data diuji dengan menggunakan Analisis varian satu arah.

5.3.2. Uji Homogenitas Varian

Hasil pengujian homogenitas data dengan menggunakan *Levene's Test* terlihat pada Tabel 5.8. sedangkan hasil selengkapnya tertera pada Lampiran 10.

Tabel 5. 8. Hasil uji Homogenitas Varians Data Variable Penelitian

Varlabel	Uji Statistik	Nilai	p	Ket
Motilitas	Levene	0,229	0,797	Homogen
MPU	Levene	1,025	0,376	Homogen
ROS	Levene	2,227	0,133	Homogen
MDA	Levene	0,339	0,717	Homogen
DHA	Levene	0,049	0,952	Homogen

Dari hasil pengujian omogenitas data dengan menggunakan uji statistik *Levene's Test* di atas menunjukkan bahwa motilitas, persentase MPU, akumulasi produksi ROS, kadar MDA dan kadar DHA membran spermatozoa adalah homogen, maka untuk melihat perbedaan antar perlakuan data diuji dengan menggunakan Analisis varian satu arah.

5.4. Hasil Analisis Statistik Variabel Tergantung

5.4.1. Analisis Statistik Persentase Membran Plasma utuh (MPU) Spermatozoa

Analisis statistik yang digunakan untuk melihat perbedaan persentase motilitas spermatozoa kontrol dengan kelompok setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll adalah analisa varian satu arah. Ringkasan hasil analisa varian satu arah dapat dilihat pada tabel 5.9, sedangkan hasil selengkapnya tertera pada Lampiran 11 .

Tabel 5.9. Hasil analisis varian satu arah persentase motilitas spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Sumber Keragaman	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Total	F	P
Perlakuan	2	68,250	34,125	7,359	0.004 **
Galat	21	97,375	4,637		
Total	23	165,625			

Superskrip **) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$)

Hasil analisis varian satu arah pada tabel 5.9 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan persentase motilitas spermatozoa yang sangat bermakna ($p=0,000$) antara kelompok kontrol dengan kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll. Selanjutnya untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji perbandingan berganda menggunakan uji LSD, ringkasan hasilnya terlihat pada tabel 5.10

Tabel 5.10. Hasil uji LSD motilitas spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

	Perbandingan nilai rerata antar perlakuan		
	KO 77,50	P1 75,25	P2 73,38
KO 77,50		2,25 ^{**} (p = 0,049)	4,13 ^{**} (p = 0,001)
P1 75,25	2,25 ^{**} (p = 0,049)		1,88 ^{tn} (p = 0,096)
P2 73,38	4,13 ^{**} (p = 0,001)	1,88 ^{tn} (p = 0,096)	

Superskrip ^{**}) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$)
^{tn}) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$)

Hasil uji LSD pada tabel 5.10 di atas menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa pada kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih rendah secara bermakna ($p = 0,049$) di bandingkan dengan kontrol dan persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p = 0,001$) dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur pada setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara tidak bermakna ($p = 0,096$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit.

5.4.2. Analisis Statistik Persentase Membran Plasma utuh (MPU) Spermatozoa

Analisis statistik yang digunakan untuk melihat perbedaan persentase MPU spermatozoa kontrol dengan kelompok setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll adalah analisa varian satu arah.

Ringkasan hasil analisa varian satu arah dapat dilihat pada tabel 5.11, sedangkan hasil selengkapnya tertera pada Lampiran 12 .

Tabel 5.11. Hasil analisis varian satu arah persentase MPU spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Sumber Keragaman	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Total	F	P
Perlakuan	2	4656,333	2328,167	115,994	0,000 **
Galat	21	421,500	20,071		
Total	23	17759,958			

Superskrip **) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$)

Hasil analisis varian satu arah pada tabel 5.11 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan persentase MPU spermatozoa yang sangat bermakna ($p = 0,000$) antara kelompok kontrol dengan kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll. Selanjutnya untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji perbandingan berganda menggunakan uji LSD, ringkasan hasilnya terlihat pada tabel 5.12

Tabel 5.12. Hasil uji LSD persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

	Perbandingan nilai rerata antar perlakuan		
	KO 79,50	P1 53,25	P2 47,50
KO 79,50		26,25 ($p = 0,000$)	32,00 ($p = 0,000$)
P1 53,25	26,25 ($p = 0,000$)		5,75 ($p = 0,018$)
P2 47,50	32,00 ($p = 0,000$)	5,75 ($p = 0,018$)	

Superskrip *) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

**) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$)

Hasil uji LSD pada tabel 5.12 di atas menunjukkan bahwa persentase MPU spermatozoa pada kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p = 0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur pada setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p = 0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur pada setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara bermakna ($p = 0,018$) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit.

5.4.3. Analisis Statistik Produksi ROS Spermatozoa

Analisis statistik yang digunakan untuk membuktikan perbedaan peningkatan produksi ROS spermatozoa kontrol dengan kelompok perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll adalah analisis varian satu arah. Ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.13. dan selengkapnya tertera pada lampiran 13.

Tabel 5.13. Hasil analisis varian satu arah produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Sumber Keragaman	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Total	F	P
Perlakuan	2	656,009	328,004	6,225	0.008 **
Galat	21	1106,513	52,691		
Total	23	1762,522			

Supersknp **) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,01$)

Hasil analisis varian satu arah pada tabel 5.13. menunjukkan bahwa produksi ROS spermatozoa kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll berbeda secara bermakna ($p=0,008$) dibandingkan dengan kontrol. Selanjutnya untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji perbandingan berganda menggunakan uji LSD, ringkasan hasilnya terlihat pada tabel 5. 14.

Tabel 5.14. Hasil uji LSD produksi ROS spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

	Perbandingan nilai rerata antar perlakuan		
	KO 6,33	P1 14,41	P2 18,98
KO 6,33	-	8,07 ($p=0,037$)	12,65 ($p=0,002$)
P1 14,41	8,07 ($p=0,037$)	-	4,58 ^{tn} ($p=0,221$)
P2 18,98	12,65 ($p=0,002$)	4,58 ^{tn} ($p=0,221$)	-

Superskrip *) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p<0,05$)

***) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p<0,01$)

tn) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermaknan ($P>0,05$)

Hasil uji LSD pada tabel 5.14. di atas menunjukkan bahwa rerata produksi ROS spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,037$) dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan rerata produksi ROS spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,002$) dibandingkan dengan kontrol. Akan tetapi rerata produksi ROS spermatozoa pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit

lebih tinggi secara tidak bermakna ($p=0.221$) dibandingkan dengan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit.

5.4.4. Analisis Statistik Kadar Malonaldehid (MDA) Spermatozoa

Analisis statistik yang digunakan untuk membuktikan perbedaan peningkatan kadar MDA spermatozoa kontrol dengan perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll adalah analisis varian satu arah. Ringkasan hasil analisis varian satu arah kadar MDA dapat dilihat pada tabel 5.15 dan selengkapnya tertera pada Lampiran 14.

Tabel 5.15. Hasil Analisis varian satu arah kadar MDA spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Sumber Keragaman	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Total	F	P
Perlakuan	2	1158,058	579,029	5,316	0,014**
Galat	21	2287,494	108,928		
Total	23	3445,552			

Ket.: Superskrip **) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p<0,05$)

Hasil analisis varian satu arah pada tabel 5.15. di atas menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll berbeda secara bermakna ($p = 0,014$) dibandingkan dengan kontrol. Selanjutnya untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll dilakukan uji perbandingan berganda menggunakan uji LSD, ringkasan hasilnya terlihat pada tabel 5.16.

Tabel 5.16. Hasil uji LSD kadar MDA spermatozoa kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

	Perbandingan nilai rerata antar perlakuan		
	KO	P1	P2
KO 20,87	20,87	32,93 12,06 ^{**} (p =0,031)	37,29 16,43 ^{**} (p =0,005)
P1 32,93	12,06 ^{**} (p =0,031)	32,93	4,37 ^{tn} (p =0,412)
P2 37,29	16,43 ^{**} (p =0,005)	4,37 ^{tn} (p =0,412)	37,29

Superskrip ^{*}) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna (p<0,05)

^{**}) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna (p<0,01)

^{tn}) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermaknan (P>0,05)

Hasil uji LSD pada tabel 5.16. di atas menunjukkan bahwa kadar MDA spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara bermakna (p =0,031) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan kadar MDA spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara sangat bermakna (P=0,005) dibandingkan dengan kontrol. Akan tetapi kadar MDA setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara tidak bermakna (p=0,412) dibandingkan dengan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit.

5.4.5. Analisis Statistik Kadar DHA membran Spermatozoa

Analisis statistik yang digunakan untuk membuktikan perbedaan penurunan kadar DHA spermatozoa kontrol dengan perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll adalah analisis varian satu arah. Ringkasan hasil analisis varian satu arah terhadap kadar

DHA spermatozoa dapat dilihat pada tabel 5.17 dan hasil selengkapnya tertera pada Lampiran 15

Tabel 5.17. Hasil analisis varian satu arah kadar DHA membran spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

Sumber Keragaman	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Total	F	P
Perlakuan	2	2396,96	1198,48	25,570	0,000**
Galat	21	984,23	46,87		
Total	23	3381,19			

Ket.: **) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$)

Hasil analisis varian satu arah pada tabel 5.17 di atas, menunjukkan bahwa kadar DHA spermatozoa pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll berbeda secara bermakna ($p = 0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Selanjutnya hasil uji perbandingan berganda menggunakan uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan, ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.18.

Tabel 5.18. Hasil uji LSD kadar DHA membran spermatozoa kontrol dan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll

	Perbandingan nilai rerata antar perlakuan		
	KO 42,61	P1 24,57	P2 19,26
KO 42,61	-	18,04 ^a ($p = 0,000$)	23,35 ^{ab} ($p = 0,000$)
P1 24,57	18,04 ^a ($p = 0,000$)	-	0,531 ^a ($p = 0,136$)
P2 19,26	23,35 ^{ab} ($p = 0,000$)	0,531 ^a ($p = 0,136$)	-

Superskrip ^a) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

^{ab}) menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$)

tn) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermaknan ($P > 0,05$)



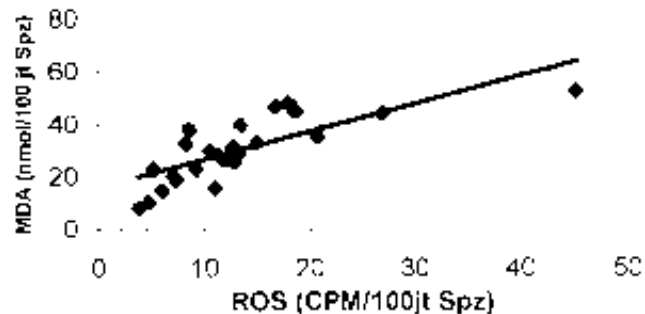
Hasil uji LSD pada tabel 5.18 di atas menunjukkan bahwa kadar DHA spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p = 0.000$) dibandingkan dengan kontrol. Demikian juga dengan kadar DHA spermatozoa pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p = 0.000$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Akan tetapi kadar DHA spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara tidak bermakna ($p = 0.136$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit.

5.4.6. Pengaruh Produksi ROS, kadar MDA dan kadar DHA terhadap persentase MPU Spermatozoa Kerbau lumpur

Untuk mengungkapkan pengaruh produksi ROS terhadap kadar MDA, kadar DHA membran dan MPU spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dilakukan dengan menggunakan uji regresi sedangkan melihat jalur mekanismenya dilakukan dengan uji jalur (path analysis)

5.4.6.1. Pengaruh Produksi ROS terhadap kadar MDA

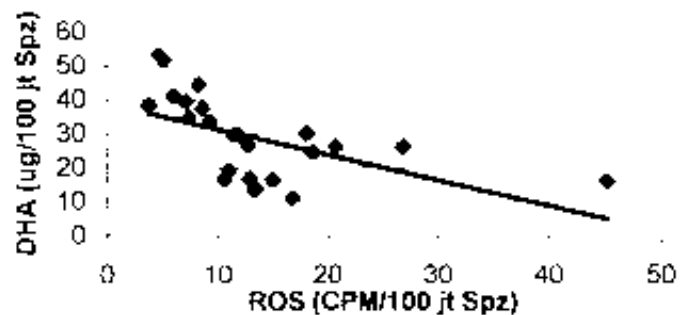
Analisis regresi sederhana menunjukkan bahwa produksi ROS berpengaruh positif terhadap kadar MDA spermatozoa dengan nilai koefisien regresi (r) = 0,757 dan nilai $p = 0,000$ ($p > 0,01$) (lampiran 16). Artinya semakin tinggi produksi ROS spermatozoa semakin tinggi pula kadar MDA yang terbentuk. Garis linier pengaruh produksi ROS dengan kadar MDA spermatozoa terlihat pada Gambar 5. 10



Gambar 5.10. Garis linier pengaruh produksi ROS terhadap kadar MDA Spermatozoa

5.4.6.2. Pengaruh Produksi ROS terhadap Kadar DHA membran

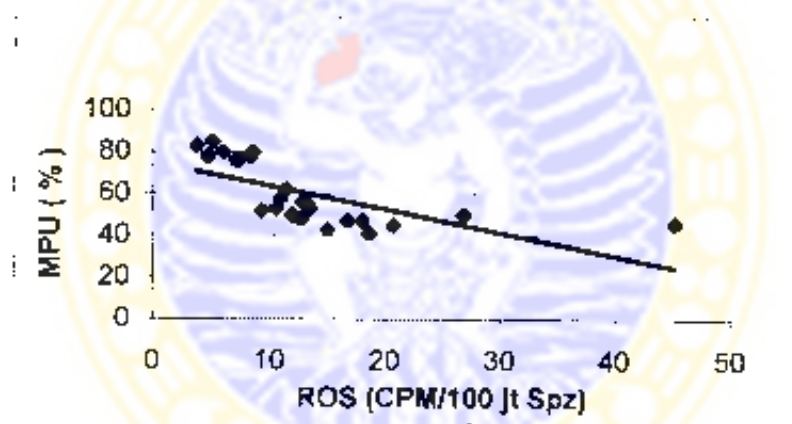
Analisis regresi sederhana menunjukkan bahwa produksi ROS berpengaruh secara negatif terhadap kadar DHA membran spermatozoa dengan nilai koefisien regresi (r) = - 0,542 dan nilai p = 0.006 ($p < 0,01$) (Lampiran 17). Artinya makin tinggi produksi ROS makin rendah kadar DHA spermatozoa. Garis linier pengaruh produksi ROS terhadap kadar DHA membran spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 5. 11.



Gambar 5.11. Garis linier pengaruh produksi ROS terhadap kadar DHA Spermatozoa

5.4.6.3. Pengaruh Produksi ROS terhadap persentase MPU Spermatozoa

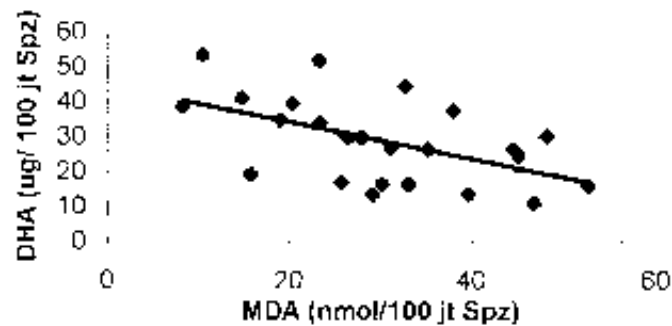
Analisis regresi sederhana menunjukkan bahwa produksi ROS berpengaruh secara negatif terhadap persentase MPU spermatozoa dengan nilai koefisien regresi (r) = - 0,655 dan nilai p = 0,001 ($p < 0,01$) (Lampiran 18). Artinya semakin tinggi produksi ROS makin rendah persentase MPU spermatozoa. Garis linier pengaruh produksi ROS terhadap persentase MPU spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 5. 12.



Gambar 5.12. Gans linier pengaruh produksi ROS terhadap MPU

5.4.6.4. Pengaruh kadar MDA terhadap kadar DHA membran

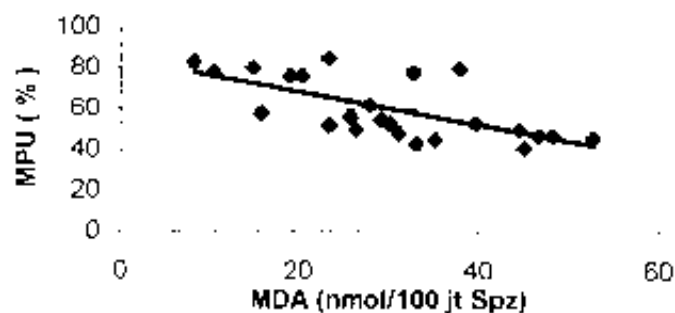
Analisis regresi menunjukkan bahwa kadar MDA berpengaruh secara negatif terhadap kadar DHA membran spermatozoa dengan nilai koefisien regresi (r) = - 0,528 dan nilai p = 0,008 ($p < 0,01$) (Lampiran 19). Artinya semakin tinggi kadar MDA yang terbentuk menyebabkan kadar DHA membran spermatozoa makin menurun. Garis linier pengaruh kadar MDA terhadap DHA terlihat pada Gambar 5. 13



Gambar 5.13. Garis linier pengaruh kadar MDA terhadap kadar DHA

5.4.6.5. Pengaruh kadar MDA terhadap persentase MPU Spermatozoa

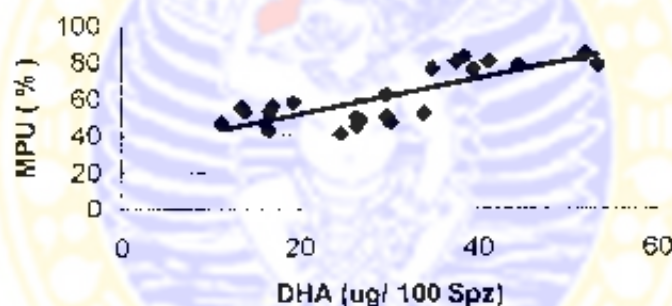
Analisis regresi sederhana menunjukkan bahwa kadar MDA berpengaruh secara negatif terhadap persentase MPU spermatozoa dengan nilai koefisien regresi (r) = - 0,657 dan nilai p = 0,000 ($p < 0,01$) (Lampiran 20). Artinya semakin tinggi kadar MDA menyebabkan persentase MPU spermatozoa makin menurun. Garis linier hubungan kadar MDA dengan persentase MPU spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 5. 14.



Gambar 5.14. Gans linier pengaruh kadar MDA terhadap persentase MPU Spermatozoa

5.4.7.6. Pengaruh kadar DHA terhadap MPU Spermatozoa

Analisis data menggunakan regresi sederhana menunjukkan bahwa kadar DHA berpengaruh secara positif terhadap persentase MPU spermatozoa dengan nilai koefisien regresi (r) = 0,788 dan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,01$) (Lampiran 21). Artinya semakin tinggi kadar DHA menyebabkan persentase MPU spermatozoa semakin meningkat. Garis linier pengaruh kadar DHA terhadap persentase MPU spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 5. 15.



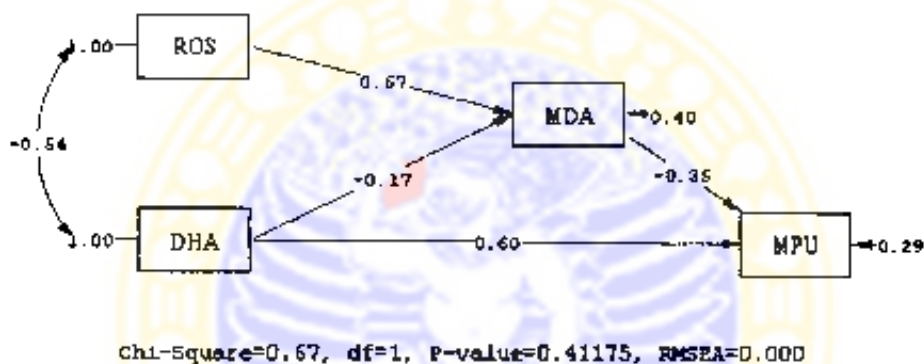
Gambar 5.15. Garis linier pengaruh kadar DHA terhadap MPU spermatozoa

5.4.8. Jalur pengaruh Produksi ROS, kadar MDA dan kadar DHA terhadap MPU Spermatozoa Kerbau Lumpur setelah Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

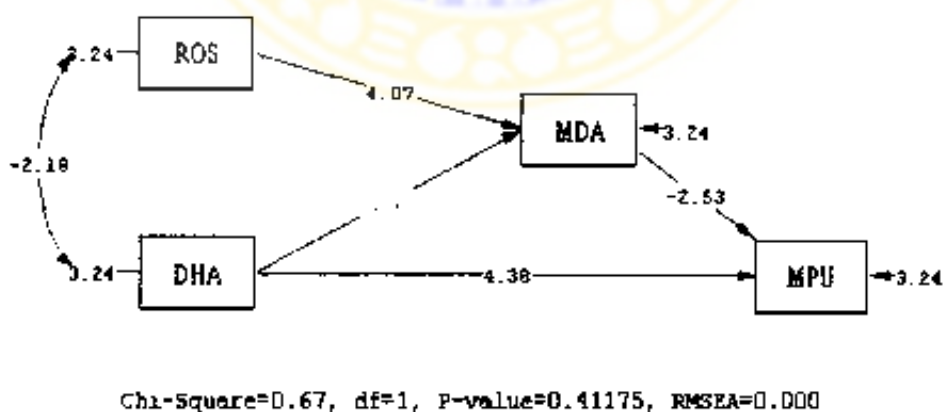
Berdasarkan kerangka teori dan konseptual, peningkatan waktu sentrifugasi gradien densitas percoll berpengaruh terhadap pembentukan senyawa oksigen reaktif, peroksidasi lipid, penurunan kadar DHA dan kerusakan integritas membran spermatozoa. Peningkatan produksi ROS akan mengakibatkan peningkatan peroksidasi lipid dan penurunan kandungan DHA serta menyebabkan penurunan persentase MPU

spermatozoa. Untuk mengungkapkan peran produksi ROS terhadap penurunan persentase MPU spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dilakukan dengan menggunakan uji jalur.

Hasil analisis jalur terhadap variabel produksi ROS, kadar MDA, kadar DHA dan persentase MPU spermatozoa terlihat pada Gambar 5.16 dan 5.17



Gambar 5.16. Skematis hasil analisis jalur antara ROS, MDA, DHA, MPU Spermatozoa yang diamati berdasarkan nilai loading factor (P)



Gambar 5.17. Skematis hasil analisis jalur antara ROS, MDA, DHA, MPU Spermatozoa yang diamati berdasarkan nilai t (nilai $t > 1.96$ menunjukkan $p < 0,05$, dan nilai $t < 1.96$ menunjukkan $p > 0,05$).

Pada gambar 5.16 dan 17 diatas dapat dilihat hasil analisis jalur dari ROS, kadar MDA, kadar DHA membran dan persentase MPU spermatozoa. Berdasarkan nilai p dan koefisien jalurnya (P) dapat disimpulkan bahwa;

- a) Produksi ROS mempengaruhi kadar DHA spermatozoa secara bermakna ($p < 0,05$) dengan koefisien jalur (-0,54). Produksi ROS mempengaruhi kadar MDA secara bermakna ($p < 0,05$) dengan koefisien jalur (0,67). Kadar DHA mempengaruhi kadar MDA secara tidak bermakna ($p > 0,05$) dengan koefisien jalur yang sangat kecil (-0,17). Jadi ROS meningkatkan kadar MDA melalui penurunan kadar DHA. Meningkatnya produksi ROS menyebabkan kadar DHA menurun dan selanjutnya meningkatkan kadar MDA.
- b) Kadar DHA mempengaruhi kadar MPU spermatozoa secara bermakna ($p < 0,05$) dengan koefisien jalur (0,60). Kadar DHA mempengaruhi kadar MDA secara tidak bermakna ($p > 0,05$) dengan nilai koefisien jalur (-0,17). Kadar MDA mempengaruhi persentase MPU secara bermakna ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien jalur (0,60). Jadi kadar DHA selain mempengaruhi persentase MPU secara langsung juga dapat melalui peningkatan kadar MDA spermatozoa. Bila kadar DHA menurun, maka kadar MDA menjadi meningkat dan selanjutnya persentase MPU menjadi menurun.
- c) Kadar MDA mempengaruhi kadar MPU spermatozoa secara sangat bermakna ($p < 0,01$) dengan koefisien jalur (-0,35). Jadi kadar MDA

mempengaruhi persentase MPU secara langsung, Makin tinggi kadar MDA akan menyebabkan persentase MPU spermatozoa menurun.

Bila produksi ROS pada suspensi spermatozoa meningkat, maka kadar MDA meningkat dan kadar DHA membran menurun yang akhirnya persentase MPU spermatozoa jadi menurun.



BAB 6

PEMBAHASAN

6. 1. Kualitas Semen Segar Kerbau Lumpur

Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen segar untuk diproses lebih lanjut adalah hasil evaluasi kualitas semen awal. Penilaian kualitas semen segar baik secara makroskopis maupun mikroskopis yang dilakukan segera setelah penampungan sangat penting artinya sebelum melakukan proses lebih lanjut terhadap semen tersebut, seperti perbanyakan volume, pembekuan maupun pemisahan spermatozoa. Kualitas semen segar yang baik sangat penting artinya untuk keberhasilan proses pemisahan spermatozoa dalam rangka penggunaan semen sebagai sumber gamet jantan untuk preseleksi jenis kelamin anak sesuai harapan. Kualitas semen yang baik harus tergambar sejak penampungan dan tetap dipertahankan sesudah proses pemisahan agar tetap layak untuk inseminasi atau dibekukan. Hasil evaluasi kualitas semen segar kerbau lumpur yang digunakan pada penelitian ini terlihat pada Tabel 5.1 dan data selengkapnya tertera pada Lampiran 5.

Volume Semen

Volume semen yang dihasilkan oleh seekor pejantan dalam satu ejakulat sangat bervariasi. Hal ini dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain kondisi masing-masing individu seperti kualitas reproduksi, umur dan kondisi manajemen peternakan. Selain itu teknik dan metode

penampungan serta persiapan alat penampungan akan mempengaruhi volume semen yang dihasilkan. Rerata volume semen segar yang diperoleh setelah penampungan pada kerbau lumpur dalam penelitian ini adalah $2,28 \pm 0,46$ ml dengan kisaran 1,80 – 3,20 ml per ejakulat. Nilai ini relatif sama dengan semen kerbau normal yang didapatkan oleh Herdis (1997) yaitu $2,20 \pm 0,42$ ml/ejakulat, tetapi lebih rendah dibandingkan dengan angka yang dilaporkan Rasul *et al.* (2001) pada kerbau murreh yaitu 2,6 – 4,3 ml/ejakulat. Namun demikian volume semen yang diperoleh ini masih dalam berkisar normal (Toelihere, 1985 dan Amin, 1998).

Warna, Konsistensi dan Konsentrasi Spermatozoa

Warna semen merupakan cerminan dari kekentalan semen dan konsentrasi spermatozoa. Dalam kondisi normal dapat dikatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi spermatozoa yang terkandung dalam semen, semakin kental konsistensi semen dan semakin pekat warnanya. Demikian juga sebaliknya pada semen yang berwarna agak pucat akan didapatkan konsentrasi dan konsistensi yang relatif rendah (Toelihere, 1985; Situmorang, 1995; Hardis, 1998 dan Rasul *et al.*, 2001). Secara umum warna semen segar kerbau lumpur yang digunakan pada penelitian berkisar dari putih sampai krem, konsistensi berkisar antara sedang sampai kental (rata-rata agak kental), dengan konsentrasi spermatozoa yang cukup baik yaitu $1,128.00 \pm 189.11$ juta spermatozoa /ml dengan kisaran antara 800 juta – 1.350 juta spermatozoa/ml. Hasil ini relatif sama dengan kisaran konsentrasi spermatozoa untuk setiap ml semen kerbau

lumpur yang dilaporkan oleh Amin (1998). Rerata konsentarsi semen segar kerbau lumpur dewasa di Indonesia adalah 600 – 1300 juta spermatozoa/ml. Akan tetapi sedikit lebih rendah dengan hasil yang diperoleh Rasul *et al.* (2001) pada kerbau lumpur di India yaitu sebesar 1.445 juta spermatozoa/ml. Adanya perbedaan ini diduga disebabkan oleh karena variasi individu hewan percobaan.

Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari pH normal akan membuat spermatozoa lebih cepat mati. Perubahan pH kearah yang lebih asam terjadi karena penimbunan asam laktat yang merupakan hasil metabolisme spermatozoa dalam kondisi anaerob. Rata-rata derajat keasaman semen segar yang diperoleh pada penelitian ini adalah $6,75 \pm 0,12$. Hasil ini relatif sama dengan yang ditemukan oleh peneliti lain di Indonesia bahwa pH semen kerbau lumpur normal rata-rata sebesar 6,2 – 7,5 (Toelihere, 1985) dan 6,8 (Amin, 1998).

Gerakan Massa, Motilitas dan Persentase Hidup Spermatozoa

Ciri utama spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai gerakan massa dan motilitas dengan daya gerak yang progresif. Gerakan massa spermatozoa merupakan cerminan dari motilitas atau gerakan individu spermatozoa. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, maka gerakan massa akan semakin baik

(semakin tebal dan pergerakannya akan semakin cepat). Rerata gerakan massa yang diperoleh dari semen segar yang digunakan pada penelitian ini adalah berkisar antara (++) sampai (+++). Hasil ini setara dengan hasil yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya bahwa gerakan massa spermatozoa kerbau lumpur berkisar antara (++) sampai (+++) dengan persentase motilitas rata-rata 76,43 % (Toelihere, 1985; Situmorang, 1995 dan Amin, 1998).

Persentase motilitas spermatozoa segar kerbau lumpur yang digunakan pada penelitian ini masing-masing sebesar $76,43 \pm 3,50$ %, hasil ini setara dengan persentase motilitas spermatozoa semen segar kerbau lumpur yang ditemukan Hardis (1998) yaitu 70 – 80 % dan kerbau Murrah yang dilaporkan Nainar *et al.* (1991) yaitu rata-rata 74,1 %. Persentase hidup spermatozoa segar kerbau lumpur yang digunakan pada penelitian ini masing-masing sebesar $86,76 \pm 2,60$ %. Persentase hidup spermatozoa kerbau lumpur yang diperoleh pada penelitian ini setara dengan dilaporkan oleh Herdis (1998) yaitu 70 % sampai 85 %.

Abnormalitas Spermatozoa

Rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa semen segar pada penelitian ini adalah $12,34 \pm 4,12$ %, relatif sama dengan yang dilaporkan oleh Sumargono (1998) yakni rata-rata 12 – 15 %. Jumlah spermatozoa abnormal yang diperoleh pada penelitian ini memenuhi syarat sebagai semen yang baik, dimana disyaratkan bahwa semen segar yang baik adalah semen dengan jumlah spermatozoa abnormal kurang dari 20 %

(Toelihere, 1985). Selanjutnya dilaporkan bahwa umur berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa abnormal, maksimum pada umur dibawah tiga tahun, menurun pada umur tiga sampai lima tahun dan meningkat lagi pada umur di atas lima tahun.

Membran Plasma Utuh Spermatozoa

Membran plasma merupakan pintu keluar masuknya zat-zat dari dalam ke luar sel atau sebaliknya. Selain itu, reseptor beberapa zat, utamanya hormon yang tergolong ke dalam kelompok protein atau asam amino juga terdapat pada membran plasma. Beberapa sinyal kimiawi dari ekstraselluler akan diterima oleh reseptor yang terdapat pada membran plasma dan diteruskan ke dalam sel dengan beberapa cara, baik melalui pergerakan aktif atau pasif dari ion-ion ligand kimiawi maupun perubahan komposisi yang dilakukan oleh sistem enzim dalam membran plasma. Apabila membran plasma spermatozoa rusak, maka proses metabolisme akan terganggu yang pada gilirannya akan menimbulkan akibat yang fatal bagi spermatozoa seperti menurunnya motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Rerata persentase MPU spermatozoa segar yang digunakan pada penelitian ini berturut-turut adalah $82,55 \pm 3,90 \%$. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan rata-rata persentase membran plasma utuh pada semen kerbau lumpur normal yaitu $78,27 \pm 3,90 \%$ (Amin, 1998) dan rata-rata persentase membran plasma spermatozoa pada semen kerbau Murah adalah $89,48 \%$ (Rasul *et al.*, 2001), Menurut Nainart *et al.*, (1991) jumlah spermatozoa dengan

membran plasma utuh pada spermatozoa kerbau Murrah normal berkisar antara 78,23 sampai 91,21 % dan yang rusak sebesar 8,79 – 13,67 %.

Berdasarkan hasil penilaian kualitas semen segar, dapat disimpulkan bahwa semen segar kerbau lumpur yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam proses pemisahan spermatozoa. Hal ini sesuai dengan apa yang dikemukakan oleh Toelihere (1985); Goyal *et al.* (1997) dan Susilawati dkk. (1998) bahwa semen segar yang memenuhi persyaratan untuk diproses lebih lanjut termasuk proses pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll harus memiliki persentase motilitas minimal sebesar 70 %, persentase hidup minimal 75 %, persentase abnormalitas spermatozoa tidak lebih dari 20 % dan memiliki konsentrasi minimal 600 juta per milliliter semen. Kondisi ini menunjukkan bahwa kerbau pejantan yang digunakan pada penelitian ini sedang berada pada puncak kematangan dalam bereproduksi dan memiliki libido yang cukup tinggi.

6.2. Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Integritas Membran Plasma Spermatozoa Kerbau Lumpur.

Keutuhan integritas membran spermatozoa termasuk membran plasma mutlak diperlukan, untuk menjamin kelangsungan hidup dan keberhasilannya membuahi sel telur. Hal ini disebabkan karena selain berfungsi melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik, membran plasma juga berperan penting sebagai filter yang baik bagi pertukaran zat-zat intra dan ekstraseluler yang diperlukan dalam proses

metabolisme (Hafez, 2000). Begitu pentingnya keberadaan membran plasma, sehingga apabila membran plasma spermatozoa rusak, maka proses metabolisme akan terganggu yang pada gilirannya akan menimbulkan akibat yang fatal bagi spermatozoa seperti menurunnya motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase MPU spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll menurun pada kedua kelompok lama sentrifugasi (Tabel 5.2). Rerata persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Demikian juga persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi terjadinya kerusakan integritas membran plasma spermatozoa kerbau lumpur. Hasil ini diperkuat dengan hasil pemeriksaan mikroskop elektron scanning sebagaimana ditunjukkan pada gambar 5.5 dimana spermatozoa hasil sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat adanya pengelupasan membran plasma pada bagian kepala dan sepanjang flagella, sedangkan spermatozoa kelompok kontrol tidak terlihat adanya kerusakan struktur membran plasma. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian beberapa peneliti terdahulu. Brandeis

and Manuel (1993) menemukan adanya penurunan integritas membran plasma spermatozoa manusia yang bermakna setelah pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinuus pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Hasil ini juga diperkuat dengan hasil penelitian Susilawati (2000) yang menemukan adanya kerusakan struktur dan fungsi membran spermatozoa sapi Bali yang sangat bermakna setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 tingkat densitas pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit.

Menurunnya persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diduga terjadi akibat pengaruh kimiawi dan mekanik langsung gaya sentrifugal seperti gesekan permukaan membran dengan partikel percoll atau dinding tabung. Beberapa peneliti melaporkan adanya gesekan mekanik yang terjadi antara permukaan spermatozoa dengan partikel percoll maupun dinding tabung selama proses sentrifugasi dapat menyebabkan deformasi matriks ekstraselluler termasuk perubahan komposisi lipid membran yang penting dalam mempertahankan fluiditas membran spermatozoa (Thanpaichirt *et al.*, 1996 dan Guzman *et al.*, 2001). Kolesterol dan fosfolipid merupakan komponen lipid membran spermatozoa yang sangat penting dalam mempertahankan integritas membran, namun sangat sensitif terhadap faktor-faktor ekstrinsik seperti suhu, kekuatan ionik dan polaritas pelarut. Dow and Bavister (1989) melaporkan bahwa serum albumin yang terkandung pada medium pencucian mempunyai peranan

penting dalam proses penghilangan kolesterol yang berfungsi menstabilkan membran plasma spermatozoa. Hal ini disebabkan karena protein tersebut mempunyai kemampuan yang kuat untuk mengikat kolesterol. Telah banyak bukti menunjukkan bahwa kadar kolesterol membran spermatozoa berkorelasi positif dengan keutuhan integritas membran plasma spermatozoa. Makin tinggi kandungan kolesterol pada membran akan membuat membran makin bersifat cair, sebaliknya makin sedikit kadar kolesterol membran menyebabkan membran spermatozoa makin cepat mengalami kerusakan (Park and Graham, 1992).

Menurunnya persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll pada penelitian ini kemungkinan lain juga dapat dipicu oleh terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa. Hal ini sejalan dengan pernyataan peneliti terdahulu bahwa membran plasma spermatozoa akan menjadi kurang stabil bila spermatozoa terpisah dengan plasma seminalis (Hafez, 2000). Plasma seminalis selain diketahui banyak mengandung bahan-bahan nutrisi bagi spermatozoa juga mengandung bahan elektrolit dan non elektrolit seperti ion natrium, kalium, protein dan asam askorbat yang penting untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan. Ion natrium dan kalium yang terdapat dalam plasma seminalis berperan penting dalam menjaga integritas fungsional membran plasma spermatozoa, protein berperan penting dalam melindungi membran plasma tetap lentur dan merupakan jaket bagi spermatozoa dari kerusakan irreversibel (Nainar *et al.*, 1991),

sedangkan asam askorbat berperan sebagai zat antioksidan yang penting untuk melindungi spermatozoa dari serangan senyawa oksigen reaktif (Aurich *et al.*, 1997). Hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa selama proses sentrifugasi gradien densitas percoll akan mengakibatkan perlindungan spermatozoa dari bahan-bahan perusak seperti serangan senyawa oksigen reaktif akan menjadi berkurang, sehingga spermatozoa mudah mengalami peroksidasi. Hal ini sesuai dengan laporan beberapa peneliti sebelumnya yang menyatakan bahwa tingginya kandungan asam askorbat dalam plasma seminalis berkorelasi positif dengan ketahanan integritas membran plasma spermatozoa setelah pembekuan (White *et al.*, 1993; Beconi *et al.*, 1997 dan Sumargono, 1998).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan persentase MPU spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll seiring dengan lama waktu sentrifugasi yang digunakan. Persentase MPU spermatozoa yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Kondisi ini berkaitan dengan lama dan besarnya gesekan mekanik pada permukaan membran spermatozoa. Makin lama gesekan mekanik yang terjadi pada membran spermatozoa, maka makin besar pula kerusakan integritas membran plasma yang terjadi pada spermatozoa. Makin tinggi tingkat kerusakan membran plasma spermatozoa akan menyebabkan persentase spermatozoa yang memiliki

membran plasma utuh makin menjadi menurun (White *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1995 dan Rasul *et al.*, 2001). Selanjutnya makin rendah persentase membran plasma utuh spermatozoa akan mempengaruhi motilitas spermatozoa *in vitro* (Alvarez and Storey, 1997; Beconi *et al.*, 1997).

Pada penelitian ini juga ditemukan penurunan persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur yang bermakna setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll. Rerata persentase setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit $75,25 \pm 2,12$ % dan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit adalah $73,38 \pm 2,45$ % lebih rendah secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan motilitas spermatozoa kontrol yaitu $77,50 \pm 1,85$ %. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Susilawati (2000) yang menemukan adanya penurunan motilitas spermatozoa sapi yang sangat bermakna setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 tingkat dengan kecepatan 2250 rpm selama 5 menit.

Menurunnya persentase motilitas spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selain diakibatkan kerusakan integritas membran juga disebabkan oleh hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa setelah proses pemisahan dan pencucian dan menggantikannya dengan medium EBSS mungkin merupakan salah satu faktor yang menyebabkan menurunnya nilai motilitas spermatozoa kerbau lumpur, bila dihubungkan dengan ketersediaan sumber energi bagi spermatozoa. Plasma seminalis selain merupakan medium transport bagi

spermatozoa juga banyak mengandung komponen-komponen elektrolit yang dapat menstimulir metabolisme untuk menghasilkan sejumlah energi berupa ATP yang penting untuk motilitas spermatozoa (Hafez, 2000). Mengingat motilitas spermatozoa sangat dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme energi spermatozoa yang ditunjang oleh lingkungan antara lain temperatur dan komponen-komponen yang terdapat dalam medium ekstraselluler. Sehingga dengan keterbatasan energi endogen yang dimilikinya dan eksogen yang dapat digunakan dari medium ekstraselluler mempengaruhi daya gerakannya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hafez (2000) bahwa motilitas spermatozoa akan menurun jika plasma seminalis diganti dengan medium lain.

6. 3. Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau Lumpur.

ROS merupakan sekelompok senyawa oksigen yang bersifat reaktif, yang secara normal berasal dari hasil samping metabolisme normal untuk menghasilkan ATP melalui fosforilasi oksidatif di mitokondria. Dalam kondisi normal sekitar 85 – 90 % oksigen diperlukan oleh mitokondria untuk menghasilkan ATP dan sekitar 1 – 3 % dari jumlah oksigen tersebut akan dirubah menjadi radikal superoksid anion ($O^{\bullet -}$) salah satu bentuk ROS melalui reaksi univalen (Halliwell and Gutteridge, 1999). Namun dalam kondisi tertentu seperti aktivitas fisik atau trauma fisik yang berat produksi $O^{\bullet -}$ dapat menjadi sangat meningkat, karena

ambilan oksigen untuk proses fosforilasi oksidatif pada mitokondria juga meningkat (de Lamirande *et al.*, 1997).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa akumulasi produksi ROS spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat pada kedua kelompok lama sentrifugasi (Tabel 5.3). Rerata akumulasi produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,037$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan akumulasi produksi ROS spermatozoa pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit adalah lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,002$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa kerbau lumpur dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi pembentukan ROS oleh spermatozoa. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh beberapa peneliti terdahulu pada spermatozoa manusia. Iwazaki and Gagnon (1992) yang menemukan adanya peningkatan akumulasi produksi ROS spermatozoa manusia setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 4 – 5 kali di atas akumulasi produksi ROS spermatozoa basal (dari 8 mV/s/ 10^9 menjadi 71 mV/s/ 10^9 spermatozoa). Agarwal *et al.* (1994) yang menemukan peningkatan produksi ROS oleh spermatozoa manusia beberapa kali kali diatas spermatozoa normal setelah pemisahan spermatozoa berulang-ulang dengan sentrifugasi

gradien densitas percoll. Demikian juga hasil penelitian Ding *et al.* (1999) yang menemukan peningkatan konsentrasi nitrit oksid (salah satu bentuk ROS) spermatozoa manusia 1 – 2 kali dari spermatozoa basal setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontineus 3 tingkat gradien.

Besarnya peningkatan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll yang ditemukan pada penelitian ini lebih rendah bila dibandingkan dengan yang ditemukan oleh Iwazaki and Gagnon (1992) pada spermatozoa manusia. Adanya perbedaan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa ini selain disebabkan oleh perbedaan spesies, juga diakibatkan oleh perbedaan kecepatan dan lama waktu sentrifugasi yang digunakan. Pada penelitian ini pemisahan spermatozoa dilakukan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontineus dengan kecepatan 850 x G selama 5 – 10 menit, sedangkan pada penelitian Iwazaki and Gagnon (1992) pemisahan spermatozoa dilakukan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontineus dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Lama dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan sangat menentukan tingkat akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa, makin lama waktu sentrifugasi gradien densitas percoll makin tinggi tingkat akumulasi produksi ROS yang dihasilkan (Shakariz *et al.*, 1996).

Meningkatnya pembentukan ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll kemungkinan

diakibatkan oleh adanya trauma mekanik pada membran spermatozoa. Aitken *et al.* (1998) yang mengungkapkan bahwa trauma fisik yang berat pada spermatozoa akibat gesekan partikel percoll atau dinding tabung selama proses sentrifugasi dapat merangsang pembentukan radikal superoksida anion oleh spermatozoa melalui peningkatan influks Ca^{2+} ion dalam sel. Halliwell and Gutteridge (1999) menyatakan tingginya konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler akan menyebabkan peningkatan ikatannya dengan kalmodulin, membentuk ikatan Ca^{2+} -kalmodulin dependent yang penting untuk mengaktifkan enzim-enzim protease seperti *calpain*. *Calpain* merupakan salah satu enzim protease yang penting untuk merubah xanthin dehidrogenase menjadi *xanthin oksidase*. Selanjutnya xanthin oksidase bersama dengan oksigen mengoksidasi xanthin dan hipoxanthin membentuk radikal superoksida anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

Hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll juga dilaporkan dapat meningkatkan akumulasi produksi ROS dalam suspensi spermatozoa. Plasma seminalis selain penting sebagai media transpor dan sumber nutrisi bagi spermatozoa juga banyak mengandung enzim-enzim dan bahan-bahan yang bersifat sebagai antioksidan seperti *superoxide dismutase (SOD)*, *catalase* dan *glutathione peroxidase* (Alvarez dan Storey, 1989) serta asam askorbat (Kumar *et al.*, 1991; Nainar *et al.*, 1993), taurin, hypotaurin dan pyruvat (de Lamirande and Gagnon, 1992) yang penting sebagai *scavenger ROS*. Berkurangnya atau hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa akan

mengakibatkan menipisnya kandungan enzim-enzim antioksidan dalam suspensi, sehingga ROS yang dihasilkan oleh spermatozoa atau yang berasal dari deaminasi oksidatif asam amino pada medium tidak mampu dinetralkan menjadi air, sehingga kadarnya dalam suspensi menjadi meningkat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Iwazaki dan Gagnon (1992) yang menemukan konsentrasi ROS spermatozoa manusia setelah pembuangan plasma seminalis meningkat 20 – 50 kali dari kadar basal (dari 8 mV/s/ 10^9 spermatozoa menjadi 406 mV/s/ 10^9 spermatozoa). Akan tetapi penambahan kembali plasma seminalis pada pellet spermatozoa dapat menurunkan konsentrasi ROS spermatozoa sebanyak 70 - 80 % (dari 406 mV/s/ 10^9 spermatozoa menjadi 61 mV/s/ 10^9 spermatozoa).

Meskipun sebagian besar akumulasi produksi ROS spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll pada penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan, namun peningkatan akumulasi produksi ROS ini merupakan respon waktu sentrifugasi. Akumulasi produksi ROS yang ditemukan pada kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,021$) dibandingkan dengan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Hal ini menunjukkan bahwa makin lama waktu sentrifugasi yang digunakan, akan menyebabkan makin tinggi produksi ROS oleh spermatozoa. Hasil ini sejalan dengan yang dilaporkan Aitken and West, (1990) bahwa periode sentrifugasi yang lebih lama dapat menginduksi pembentukan ROS dalam subpopulasi spermatozoa dengan

fungsi membran yang kurang optimal. Pernyataan ini diperkuat oleh hasil penelitian Shakariz *et al.* (1995) yang menemukan konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa manusia setelah sentrifugasi selama 10 menit lebih tinggi secara sangat bermakna dibandingkan dengan konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa setelah sentrifugasi selama 2 menit (96,37 CPM/ juta spermatozoa vs 18,36 CPM/ juta spermatozoa). Dari hasil penjelasan di atas dapat disimpulkan bahwa pemisahan spermatozoa kerbau lumpur dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat meningkatkan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa. Tingkat produksi ROS oleh spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dipengaruhi oleh lama sentrifugasi gradien densitas percoll yang digunakan. Makin lama sentrifugasi makin tinggi tingkat akumulasi produksi ROS dalam suspensi spermatozoa.

6. 4. Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Tingkat Peroksidasi lipid Spermatozoa Kerbau Lumpur.

Peroksidasi lipid merupakan salah satu proses yang menggambarkan terjadinya stress oksidatif pada suatu sel atau jaringan. Secara luas peroksidasi lipid diartikan rusaknya asam lemak poli tak jenuh (*polyunsaturated fatty acid/ PUFA*) secara oksidatif sebagai konsekuensi dari terbentuknya senyawa oksigen reaktif dalam sel atau organ (Halliwell and Gutteridge, 1999). Hasil akhir dari peroksidasi lipid adalah terputusnya ikatan asam lemak poli tak jenuh menjadi senyawa aldehyd. MDA merupakan senyawa aldehyd yang dihasilkan karena pemutusan rantai

asam lemak poli tak jenuh seperti oleat, linolenat, arakidonat dan dekoksaheksanoat akibat peroksidasi oleh senyawa oksigen reaktif (Halliwell and Gutteridge, 1999). Makin tinggi kadar MDA dalam suspensi spermatozoa yang terbentuk menunjukkan bahwa makin tinggi tingkat peroksidasi lipid yang terjadi pada membran sel spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995; Sodergren, 2000 dan Sujarwo, 2001).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat pada kedua kelompok waktu sentrifugasi (Tabel 5.4). Rerata kadar MDA spermatozoa yang ditemukan pada kelompok setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara bermakna ($p=0,031$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan kadar MDA spermatozoa pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,005$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi terjadinya peroksidasi lipid membran spermatozoa, karena MDA sebagai salah satu produk peroksidasi lipid pada membran sel mengalami peningkatan. Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Huszar and Vigue (1994) yang menemukan adanya peningkatan kadar MDA spermatozoa manusia secara sangat bermakna setelah pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.

Meningkatnya kadar MDA spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll berkaitan dengan meningkatnya akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa selama proses sentrifugasi dan rendahnya kandungan enzim-enzim antioksidan dalam suspensi spermatozoa. Sebagaimana telah diungkapkan sebelumnya bahwa akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat secara sangat bermakna dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll tidak diimbangi dengan peningkatan aktivitas enzim antioksidan pada suspensi spermatozoa untuk menentralsirnya, sehingga senyawa oksigen reaktif ($O_2^{\cdot -}$) akan bereaksi dengan indikator Fe^{2+} atau Cu^+ membentuk senyawa oksigen yang lebih reaktif lagi seperti radikal hidroksil (OH^{\cdot}). Pada membran sel radikal hidroksil dapat bereaksi dengan komponen asam lemak khususnya asam lemak poli tak jenuh terikat fosfolipid, membentuk reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Akhir dari reaksi ini akan menyebabkan putusanya ikatan rantai-rantai asam lemak membentuk senyawa aldehid termasuk *malondialdehyde* (MDA) (Suryohudoyo, 2000). Hasil ini sejalan dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya bahwa, besarnya tingkat peroksidasi lipid pada membran spermatozoa secara *in vitro* ditentukan oleh konsentrasi oksigen dan temperatur, produksi senyawa oksigen reaktif, ketersediaan enzim-enzim antioksidan pada spermatozoa dan kandungan asam lemak poli tak jenuh terikat fosfolipid

membran (Alvarez and Storey, 1995). Makin tinggi konsentrasi ROS dalam media, maka makin tinggi tingkat peroksidasi lipid sebagaimana diukur dengan peningkatan kadar MDA dalam suspensi spermatozoa. Sebaliknya makin tinggi aktivitas enzim-enzim antioksidan dalam media, maka makin rendah tingkat peroksidasi lipid membran yang terjadi (Alvarez *et al.*, 1987). Keseimbangan diantara faktor-faktor ini akan menentukan keseluruhan besarnya tingkat peroksidasi lipid secara *in vitro* (Alvarez and Storey, 1995).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar MDA setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara tidak bermakna ($p=0,412$) bila dibandingkan dengan kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Meskipun secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna, namun ada suatu kecenderungan bahwa makin lama waktu sentrifugasi makin tinggi kadar MDA yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa peroksidasi lipid dan pembentukan ROS pada perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Hal ini sesuai pernyataan yang dilaporkan oleh Alvarez *et al.* (1987) bahwa makin tinggi konsentrasi ROS dalam media, maka makin tinggi tingkat peroksidasi lipid yang terjadi sebagaimana diukur dengan peningkatan kadar MDA. Dengan demikian dapat diprediksikan bahwa makin tingginya tingkat peroksidasi lipid yang terjadi akan makin banyak rantai asam

lemak yang putus menjadi senyawa aldehid, sehingga akan lebih banyak pula kadar MDA yang terbentuk. Dari hasil uraian di atas dapat disimpulkan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi terjadinya peroksidasi lipid membran sebagaimana dibuktikan dengan peningkatan kadar MDA dalam suspensi spermatozoa kerbau lumpur. Makin lama waktu pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll, makin tinggi tingkat peroksidasi lipid membran yang terjadi sebagaimana terlihat dengan peningkatan kadar MDA dalam suspensi spermatozoa.

6. 5. Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll terhadap Profil Asam Lemak Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur.

Lipid merupakan komponen utama spermatozoa yang berkontribusi pada struktur membran dan berperan penting dalam mempertahankan integritas dan kelangsungan hidup spermatozoa secara keseluruhan termasuk proses kapasitasi, reaksi akrosom dan fusi spermatozoa dengan sel telur. Secara *in vitro* lipid membran terlibat dalam mekanisme retensi sel terhadap syok akibat suhu dingin dan peroksidasi aerobik yang dimetabolisir secara aktif. Peran fungsional lipid membran berhubungan dengan komposisi, pengaruh-pengaruh umum bagian biofisikal membran dan ketidakstabilannya terhadap faktor-faktor ekstrinsik seperti suhu, kekuatan ionik dan polaritas pelarut (Alvarez and Storey, 1995). Beberapa peneliti melaporkan bahwa sebagian besar lipid membran spermatozoa mamalia didominasi oleh asam lemak poli tak jenuh. *Decoxahexanoic*

acid (DHA) merupakan asam lemak poli tak jenuh terpenting membran spermatozoa, selain penting untuk mengatur fluiditas membran, juga merupakan substrat utama dari peroksidasi lipid (Kelso *et al.*, 1997).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll kadar DHA membran spermatozoa kerbau lumpur menurun pada kedua perlakuan lama waktu sentrifugasi (Tabel 5.5). Rerata kadar DHA membran spermatozoa yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p=0,001$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Demikian juga kadar DHA membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p=0,000$) dibandingkan dengan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi penurunan kadar DHA membran spermatozoa kerbau lumpur. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Tanphaichitr *et al.* (1996) menemukan adanya penurunan kandungan fosfolipid membran spermatozoa kelinci yang sangat bermakna (menjadi setengahnya dari total kandungan fosfolipid spermatozoa basal) setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 2 tingkat pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Guzman *et al.*, (2001) menemukan adanya penurunan kadar kolesterol dan DHA membran spermatozoa

manusia yang sangat bermakna setelah fraksionasi dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 3 tingkat selama 20 menit pada kecepatan 2000 rpm. Namun bila dilihat dari nilai kadar DHA membran yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan Gusman *et al.* (2001) pada spermatozoa manusia. Perbedaan ini selain perbedaan spesies juga diakibatkan oleh perbedaan metode pengamatan yang digunakan. Pada penelitian ini pengamatan kadar DHA membran spermatozoa dilakukan dengan Gas Chromatography (GC), sedangkan Guzman *et al.* (2000) dilakukan dengan menggunakan HPTLC (*high performance thin layer chromatography*) yang tingkat akurasinya lebih tinggi.

Menurunnya kadar DHA membran spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya hidrolisis komponen lipid yang disertai dengan peroksidasi asam lemak oleh senyawa oksigen reaktif. Meskipun jauh lebih rendah dari spermatozoa sapi, tingginya kandungan asam lemak poli tak jenuh DHA (50 – 70 %) pada spermatozoa kerbau lumpur membuat mereka mudah mengalami peroksidasi. DHA merupakan asam lemak poli tak jenuh terpenting pada membran spermatozoa, yang memiliki ikatan ganda karbon tak terkonjugasi yang dipisahkan oleh gugus methylen yang sangat rawan terkena peroksidasi. Aitken and Fisher (1994) menyatakan bahwa adanya ikatan ganda di dekat gugus methylen menyebabkan ikatan methylen karbon-hidrogen jadi lebih lemah, sehingga

hidrogen menjadi lebih rentan mengalami abstraksi. Akibat akhir dari peroksidasi lipid ini menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa aldehid. Dengan demikian makin tinggi tingkat peroksidasi lipid yang terjadi akan semakin banyak ikatan asam lemak poli tak jenuh yang terputus dan selanjutnya akan menyebabkan kandungan DHA membran spermatozoa menjadi menurun (Doreta and Kurpisz, 2004).

Pada penelitian ini terlihat bahwa kadar DHA membran spermatozoa yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara tidak bermakna ($p=0,136$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit. Meskipun secara statistik tidak ada perbedaan yang bermakna, namun ada suatu kecenderungan bahwa semakin lama waktu sentrifugasi gradien densitas percoll yang digunakan akan semakin tinggi tingkat penurunan kadar DHA membran spermatozoa. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Phelps et al. (1999) yang menemukan kandungan fosfolipid membran spermatozoa kelinci setelah sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinueus selama 20 menit lebih rendah dibandingkan dengan kadar fosfolipid membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit.

6. 6. Pengaruh Akumulasi Produksi ROS, kadar MDA dan kadar DHA membran terhadap Persentase MPU Spermatozoa

Berdasarkan hasil analisis regresi terhadap variabel-variabel akumulasi produksi ROS, kadar MDA, kadar DHA dan persentase MPU menunjukkan bahwa;

1. Akumulasi produksi ROS berpengaruh secara positif terhadap kadar MDA dengan nilai koefisien regresi ($r=0,757$), nilai p yang bermakna ($p=0,000$) serta berpengaruh secara negatif terhadap kadar DHA membran dan persentase MPU spermatozoa dengan nilai koefisien regresi masing-masing adalah $r = -0,542$ ($p=0,006$) dan $r = -0,655$ ($p=0,001$). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa menyebabkan kadar MDA yang terbentuk semakin meningkat dan selanjutnya kadar DHA membran semakin menurun.

Berdasarkan teori radikal bebas fenomena ini dapat dijelaskan bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi pembentukan ROS oleh spermatozoa. Semakin lama waktu sentrifugasi semakin tinggi tingkat pembentukan ROS oleh spermatozoa dan semakin tinggi akumulasinya dalam suspensi spermatozoa (Aitken and West, 1990 dan Shakarriz *et al.*, 1996). Pada proses pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll peningkatan pembentukan ROS oleh spermatozoa, khususnya pembentukan radikal superoksida anion ($O_2^{\cdot-}$) sangat tinggi. Dalam kondisi

normal peningkatan pembentukan radikal superoksida anion akan dinetralkan oleh enzim antioksidan yang ada pada spermatozoa dan plasma seminalis menjadi air. Namun rendahnya kandungan antioksidan pada suspensi sebagai akibat hilangnya plasma seminalis menyebabkan produksi radikal superoksida anion yang terbentuk tidak mampu dinetralkan menjadi H_2O , sehingga dengan berbagai reaksi, radikal superoksida anion yang tidak dinetralkan ini akan berubah menjadi senyawa oksigen yang lebih reaktif seperti radikal hidroksil (OH^{\bullet}) melalui reaksi Fenton atau reaksi Haber Weiss dengan bantuan katalisator Fe^{2+} dan Cu^{2+} (Halliwell and Gutteridge, 1999). Pada membran sel, OH^{\bullet} dapat mengadakan sejumlah reaksi dengan komponen asam lemak membran, khususnya asam lemak poli tak jenuh yang memiliki ikatan karbon ganda yang mengakibatkan terjadinya reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid pada membran sel menyebabkan terputusnya rantai asam lemak yang memiliki ikatan ganda karbon seperti DHA dan arakidonat menjadi senyawa yang toksik terhadap sel, antara lain malondialdehid (MDA) (Alvarez and Storey, 1995). Semakin tinggi akumulasi produksi ROS dalam suspensi spermatozoa akan menyebabkan semakin banyak pemutusan ikatan asam lemak poli tak jenuh khususnya DHA akan menyebabkan kandungannya dalam membran semakin menurun dan akhirnya kadar MDA dalam suspensi spermatozoa menjadi

semakin meningkat. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Alvarez and Storey (1995) yang mengungkapkan bahwa besarnya tingkat peroksidasi lipid pada spermatozoa *in vitro* ditentukan oleh tingginya konsentrasi senyawa oksigen dan temperatur dalam medium ekstraselluler, produksi ROS dan keberadaan enzim antioksidan pada spermatozoa serta kandungan asam lemak polik jenuh terikat membran spermatozoa. Makin tinggi akumulasi produksi ROS dalam media, maka makin tinggi tingkat peroksidasi lipid dan kerusakan integritas membran spermatozoa yang terjadi sebagaimana yang diukur dengan peningkatan kadar MDA. Sebaliknya makin tinggi aktivitas enzim antioksidan dalam media, maka makin rendah tingkat peroksidasi lipid membran yang terjadi.

2. Kadar MDA berpengaruh secara negatif terhadap kadar DHA dan persentase MPU spermatozoa dengan nilai koefisien regresi masing-masing adalah $r = -0,528$ ($p=0,008$) dan $r = -0,657$ ($p=0,000$). Kadar DHA membran berpengaruh positif terhadap persentase MPU spermatozoa dengan nilai koefisien regresi adalah $r=0,788$ ($p=0,000$) Hal ini menunjukkan bahwa makin tinggi kadar MDA membran spermatozoa setelah sentrifugasi maka makin rendah kadar DHA yang terbentuk dan selanjutnya persentase MPU spermatozoa makin menurun

Meningkatnya akumulasi produksi ROS khususnya anion superoksid oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan

sentrifugasi gradien densitas percoll, menyebabkan semakin banyak juga senyawa hydrogen peroksida dan radikal hidroksil yang terbentuk. DHA merupakan asam lemak poli tak jenuh terpenting pada membran spermatozoa, yang memiliki ikatan ganda karbon tak terkonjugasi yang dipisahkan oleh gugus methylen. Aitken and Fisher (1994) menyatakan adanya ikatan ganda di dekat gugus methylen menyebabkan ikatan methylen karbon-hidrogen menjadi lebih lemah, sehingga hydrogen menjadi lebih rentan mengalami peroksidasi. Akibat akhir dari peroksidasi lipid ini menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa aldehid. Semakin tinggi tingkat peroksidasi lipid yang terjadi pada membran, akan menyebabkan semakin banyak ikatan asam lemak poli tak jenuh yang terputus menjadi senyawa aldehid seperti malonaldehyde (MDA). Dengan demikian semakin banyak terputusnya rantai asam lemak poli tak jenuh akan menyebabkan menurunnya kandungan DHA membran spermatozoa. Semakin rendah kadar DHA membran akan menyebabkan persentase MPU menjadi menurun. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan oleh beberapa peneliti terdahulu yang menemukan ada korelasi yang sangat bermakna antara peningkatan kadar MDA dengan penurunan kadar DHA dengan penurunan integritas membran plasma spermatozoa in vitro (Alvarez and Storey, 1995; Wiendari, 1998 dan Duru *et al.*, 2000).

Berdasarkan apa yang telah diuraikan diatas, maka kerusakan integritas membran sebagaimana yang dicerminkan dengan penurunan persentase MPU spermatozoa yang terjadi akibat pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terbukti dapat dijelaskan melalui aktivitas senyawa oksigen reaktif. Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll menyebabkan meningkatnya metabolisme sel, yang selanjutnya akan meningkatkan produksi ROS oleh spermatozoa. Peningkatan produksi ROS oleh spermatozoa bila tidak mampu dinetralsir oleh enzim antioksidan pada plasma seminalis secepat dan sebesar ROS yang terbentuk, maka akan terjadi ketidak seimbangan antara produksi ROS dan antioksidan dalam sel. ROS yang tidak sempat dinetralsir akan merusak integritas membran sel, melalui sejumlah reaksi yang membentuk senyawa-senyawa radikal baru dengan komponen-komponen penyusun membran sel seperti lipid dan protein (enzim, reseptor, antibody, matrik sel dan sitoskeleton) yang memegang peranan penting dalam kehidupan sel. Semakin lama waktu sentrifugasi gradien densitas percoll yang dilakukan terhadap spermatozoa, semakin tinggi dan reaktifnya ROS yang terbentuk, selanjutnya akan semakin banyak ROS yang tidak mampu dinetralsir oleh antioksidan dan akhirnya semakin tinggi pula tingkat kerusakan membran sel.

6. 7. Jalur Mekanisme peran akumulasi produksi ROS, kadar MDA dan DHA terhadap persentase MPU spermatozoa

Berdasarkan hasil analisis jalur (*path analysis*) terhadap variable akumulasi produksi ROS, kadar MDA, kadar DHA dan persentase MPU spermatozoa pada Gambar 5.15 dan 5.16 menunjukkan bahwa akumulasi produksi ROS berpengaruh terhadap kerusakan integritas membran spermatozoa terjadi secara tidak langsung melalui 3 jalur yaitu;

1. akumulasi produksi ROS berpengaruh secara langsung ke kadar MDA dengan nilai koefisien jalur (P)= 0,67 dan kadar MDA berpengaruh secara langsung ke persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dengan nilai koefisien jalur (P= -0,35).
2. akumulasi produksi ROS berpengaruh langsung ke kadar DHA membran dengan nilai koefisien jalur (P)= -0,54. Kadar DHA berpengaruh secara langsung ke kadar MDA dengan koefisien path (P= -0,17) dan kadar MDA berpengaruh secara langsung ke persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dengan nilai koefisien jalur (P= -0,35).
3. akumulasi produksi ROS berpengaruh secara langsung ke kadar DHA dengan nilai koefisien jalur (P=-0,64) dan kadar DHA berpengaruh secara langsung ke persentase MPU dengan nilai koefisien jalur (P= 0,79). Tingkat akumulasi produksi ROS berpengaruh terhadap tingkat persentase MPU spermatozoa terjadi secara tidak langsung terutama melalui peningkatan kadar MDA dan penurunan kadar DHA membran spermatozoa.

Jadi besarnya pengaruh akumulasi produksi ROS terhadap kerusakan integritas membran spermatozoa secara tidak langsung adalah sebagai berikut;

- a. Akumulasi produksi ROS ke MDA, kemudian MDA ke MPU, dengan koefisien jalur pengaruh tidak langsung = $0,67 \times 0,35 = 0,2345$. Berarti kontribusi relatif adalah $(0,2345)^2 = 0,0549$.
- b. Akumulasi produksi ROS ke DHA, kemudian DHA ke MDA dan akhirnya MDA ke MPU dengan koefisien jalur pengaruh tidak langsung = $0,54 \times 0,17 \times 0,60 = 0,0551$. Berarti kontribusi relatif $(0,0551)^2 = 0,00303$.
- c. Akumulasi produksi ROS ke DHA, kemudian DHA ke MPU dengan koefisien jalur pengaruh tidak langsung = $0,54 \times 0,60 = 0,3240$. Berarti kontribusi relatif $(0,3240)^2 = 0,10498$.

Jadi pengaruh total (total effect) akumulasi produksi ROS terhadap tingkat penurunan persentase MPU spermatozoa setelah sentrifugasi melalui ketiga jalur diatas adalah $0,2345 + 0,0551 + 0,3240 = 0,6136$.

Hasil penelitian ini dapat diketahui besarnya kontribusi relatif pengaruh akumulasi produksi ROS terhadap penurunan persentase MPU spermatozoa adalah = $(0,6136)^2 = 0,3765$ atau 37,65 %. Hal ini menunjukkan bahwa sekitar 62,35 % kerusakan integritas membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dipengaruhi oleh faktor lain yang belum dapat dijelaskan pada penelitian ini. Sebagaimana

diketahui bahwa mekanisme kerusakan integritas membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dipengaruhi oleh faktor lain seperti gesekan mekanik, tekanan osmotik pengencer, pH pengencer, ketersediaan komponen nutrisi sebagai sumber energi, enzim-enzim yang diperlukan dalam proses glikolitik dan hilang plasma seminalis dari spermatozoa (Hafez, 2000).

Dari tinjauan pustaka dan fakta-fakta yang dilaporkan dari hasil penelitian terdahulu serta fakta yang ditemukan pada penelitian ini, menunjukkan bahwa kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selain disebabkan oleh pengaruh mekanik dan kimiawi juga dapat dipicu oleh peningkatan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa. Kecepatan dan respon pembentukan ROS oleh spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll sangat tergantung pada lama waktu sentrifugasi yang digunakan. Makin lama waktu sentrifugasi yang digunakan, menyebabkan pembentukan ROS oleh spermatozoa semakin meningkat (Shakarriz *et al.*, 1996). Peningkatan pembentukan ROS khususnya anion superoksida bila tidak diimbangi oleh kemampuan enzim antioksidan untuk menetralsirnya menjadi hidrogen peroksida dan air, akan bereaksi dengan ion Fe^{2+} atau Cu^{2+} yang ada dalam medium, membentuk senyawa radikal-radikal baru yang lebih toksik seperti radikal hidroksil (OH^{\cdot}). Senyawa OH^{\cdot} ini sangat toksik dan mampu bereaksi dengan komponen-komponen membran sel terutama asam-asam lemak poli tak jenuh dan

membentuk reaksi berantai yang akan menyebabkan putusya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang toksik terhadap sel (Suryohudoyo, 2000). Dengan demikian semakin banyak produksi ROS semakin banyak asam lemak tak jenuh yang terurai, sehingga akan semakin tinggi kadar MDA yang terbentuk dan akhirnya kadar DHA terikat membran membran spermatozoa menjadi semakin menurun. DHA merupakan asam lemak poli tak jenuh terikat fosfolipid membran yang penting dalam mengatur fluiditas membran yang dibutuhkan untuk memelihara berbagai aktivitas enzim dan penyempurnaan peristiwa fusi membran dengan oosit (Kelso *et al.*, 1997). Karena itu pengurangan kadar DHA pada spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diduga dapat menyebabkan penurunan fluiditas membran spermatozoa. Dengan demikian adanya penurunan kadar DHA cenderung membuat membran spermatozoa menjadi kurang kuat dan mudah mengalami kerusakan (Douvard *et al.*, 2000; Dorota and Kurpisz, 2004).

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis penelitian dan pembahasan dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat meningkatkan akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan kadar asam DHA membran dan penurunan persentase integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa kerbau lumpur.
2. Ada perbedaan tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan kadar asam lemak DHA membran dan penurunan persentase integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa kerbau lumpur setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dengan 10 menit. Tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid, penurunan kadar asam lemak DHA membran, dan persentase integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa kerbau lumpur setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi dari pada setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit.
3. Tingkat akumulasi produksi ROS, peroksidasi lipid dan penurunan kadar asam lemak DHA membran berpengaruh terhadap

penurunan persentase integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll. Tingkat akumulasi produksi ROS berpengaruh secara positif dengan tingkat peroksidasi lipid dan berpengaruh negatif dengan penurunan kadar asam lemak DHA membran spermatozoa. Tingkat peroksidasi lipid berpengaruh negatif dengan penurunan kadar asam lemak DHA membran dan bersentase MPU spermatozoa. Tingkat penurunan kadar asam lemak DHA pengaruh secara positif dengan persentase MPU spermatozoa. Makin tinggi akumulasi produksi ROS makin tinggi tingkat peroksidasi lipid dan kadar asam lemak DHA membran serta persentase MPU spermatozoa semakin menurun.

4. Tingkat akumulasi produksi ROS berpengaruh terhadap secara langsung terhadap tingkat peroksidasi lipid dan penurunan kadar asam lemak DHA membran spermatozoa. Tingkat peroksidasi lipid dan penurunan kadar asam lemak DHA membran berpengaruh secara langsung terhadap persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa. Jadi tingkat akumulasi produksi ROS berpengaruh terhadap tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau lumpur secara tidak langsung melalui peningkatan peroksidasi lipid membran dan penurunan kadar asam lemak DHA membran spermatozoa.

7. 2. Saran

1. Untuk menghindari terjadinya kerusakan integritas membran spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll khususnya untuk preseleksi jenis kelamin anak pada kerbau lumpur, hendaknya perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll sebaiknya dilakukan pada kecepatan sentrifugasi 850 x G selama 5 menit
2. Untuk mengetahui sejauhmana pengaruh akumulasi produksi ROS terhadap kerusakan integritas membran spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll, diperlu penelitian lanjutan;
 - 2.1. Mengungkapkan kerusakan jaringan pada level protein struktural, khususnya enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme kapasitasi dan fertilisasi.
 - 2.2. Mengungkapkan kerusakan pada level DNA, khususnya DNA mitokondria sebagai manifestasi aktivitas senyawa oksigen reaktif akibat pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll.
 - 2.3. Mempelajari sejauh mana peran antioksidan dalam melindungi kerusakan integritas membran spermatozoa akibat akumulasi produksi ROS selama proses pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., I. Ikemoto and K.R. Loughlin, 1994. Relationship of Sperm parameter to level of reactive oxygen species in semen specimens. *J. Urol* 152; 107 – 110.
- Agarwal, A., I. Ikemoto and K.R. Loughlin, 1994. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim up and L4 filtration methods. *Arch Androl* 32: 169 – 174.
- Agarwal, A., I. Ikemoto and K.R. Loughlin, 1994. Effect of sperm Washing on reactive oxygen species level in semen. *Arch Androl* 33: 157 - 162.
- Agarwal, A., R. A. Saleh and M.A. Bedaiwy 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79: 829 – 843
- Aitken R. J., Clarkson J.S. and H. Fishert, 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxydation and human sperm function. *Biol Reprod.* 40; 183 – 197
- Aitken R. J., and K.M. West, 1990. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradient, *Int. J. Androl* 3: 433 - 451
- Aitken R. J., Buckingham D. W. and K.M. West, 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa; analysis of the cellular mechanisms involved in luminol-and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J. Cell Physiol* 151; 466-477
- Aitken R. J. D. Harkiss and D. W. Buckingham 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol. Reprod. and Dev.* 35: 302 -315
- Aitken R. J., 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 6: 19 – 24.
- Aitken R. J. and H.M. Fishert, 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa; the balance of benefit and risk *BioEssay*; 16; 259 – 267
- Aitken R. J., 1995. Free radicals, lipid peroxidation, sperm function. *Reprod. Fertil Dev.* 7: 659-668.

- Aitken R.J. 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 169 - 173
- Aitken R. J., H.M. Fishert, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis, S. Irvine, 1997. Reactive Oxygen species Generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.* 47; 468 – 482
- Aitken R. J., E. Gordon, H. Diana, J.P. Twigg, M. Philip, J. Zoe and D.S. Irvine, 1998. Relative impact of oxydative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59 : 1037 – 1046
- Aitken R.J. and C. Krausz, 2001. Oxydative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122; 497 - 506.
- Alvarez, J.G., and B.T. Storey, 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa, *Biol. Reprod.* 30; 323 - 332
- Alvarez, J.G., Touchstone J.C. Blasco, L. and Storey B.T. 1987. Spontaneous lipid preoxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa – superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Androl.* 8 : 336-348
- Alvarez, J.G., and B.T. Storey, 1989. Role of glutathion peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamet Res.* 23; 77 - 90
- Alvarez, J.G., and B.T. Storey, 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa *Mol. Reprod. Dev.* 42 : 334 – 345
- Amin, R.M. 1998. Efek plasma semen sapi dan berbagai pengencer dalam meningkatkan kualitas semen beku kerbau lumpur (bubalus bubalis). Thesis Pascasarjana IPB, Bogor.
- Anand, S A. Rao and M. Jain. 1979. Buffalo sperm metabolism; an assessment of motility, live sperm count and leakage of acrosomal enzymes from buffalo spermatozoa during dilution and preservation. Proceeding seminar at Indian National Dairy Research Institute. Food and Agriculture Organization of The United National. Roma

- Anhar, M., Graham, E.F. and Iqbal, N. 1997. Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion - exchange column, *Theriogenology* 10 (4) : 261 - 5
- Asikin N. 2001. Antioksidan endogen dan penilaian status antioksidan. Kursus penyegaran 2001, Radikal dan Antioksidan dalam Kesehatan Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Alam. Bag. Biokimia FKUI: 1 - 17
- Austin, C. H and Short, T. 1990. Oogenesis and Ovulation, The egg, spermatogenesis and Fertilization in Germ Cell and Fertilization Reproduction in Mammals 1. Editor Austin, C.H. and Short, Ed 2 th. Camriedge University Press. Cambridge England, pp. 46 - 164
- Batossama, J. T. 1985. Penerapan Tehnologi Inseminasi Buatan untuk Pelestarian sumberdaya ternak kerbau Belang. Disertasi Fakultas Pascasarjana IPB Bogor.
- Bize, I., G. Santander, P. Cabello, C. Driscoll and C. Sharpe, 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 44: 398 - 403.
- Brandeis, V. T. and M.T. Manuel. 1993. Effect of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *J. Assists. Reprod Genet*, Aug: 10 (6): 409 - 416
- Brouwers J.F. and B. M. Gadella. 2003. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radic. Biol Med*. 1: 35 (11): 1382 - 1391
- Check, J.H., D. Kwirenk , D. Katsoff, M. Press, E. Breen and Z. Baker, 1994. Male:female sex ratio in births resulting from IVF according to swim-up versus percoll preparation of inseminated sperm. *Arch. Androl* 33: 63 - 65
- Check, M.L., C.R.A. Bollendorf, J.H. Check, W. Hourani, R. Long and M. McMonagle, 2000. Separation of sperm through a 12 layer percoll column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. *Arch. Androl* 44 (1); 47 - 50
- Correa, J.R., G. Heersche and P.M. Zavos, 1996. Sperm mambrane functional integrity and response of frozen thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*, 47: 715 - 723.

- Cross, N.L. 1996. Effect Cholesterol and other sterols on human sperm acrosom responsiveness, *Mol. Reprocd Dev.* 45: 212 - 217
- Cross, N.L. 1998. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation, *Journal Biologi of Reproduction* 59, pp 7 - 11
- Cross, N.L. 2000. Sphingomyelin Modulates Capacitation of Human Sperm In Vitro. *Journal Biologi of Reproduction* 63, 1129 -1134
- Cross, N.L. 2003. Decrease in Order of Human Sperm Lipids During Capacitation. *Journal Biologi of Reproduction* 69, 529 - 534
- Curry, M.R and Watson,P.F. 1995. Sperm structure and function in Gametes the Spermatozoon. Cambridge Reviews in Human Reproduction, Ed. J.G. Grudzinskas & J.L. Yovich, Cambridge University Press
- Darnell J., H. Lodish, and D. Baltimore, 1990. Moleculer Cell Biology. 2nd edition. *Sci. Am. Books.* Pp. 491 - 527
- Dasrul, 1999. Uji kualitas, Integritas membran spermatozoa kerbau lumpur hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien percoll dan filtrasi sephadexs. Laporan penelitian PHB VI tahun pertama. Universitas Syiah Kuala Banda Aceh.
- Dasrul, 2000. Upaya pembekuan embrio kerbau hasil fertilisasi in vitro dengan spermatozoa sexing. Laporan penelitian PHB VI tahun ke 2. Universitas Syiah Kuala Banda Aceh.
- De Lamirande. E and C. Gagnon, 1993. Human Sperm Hyperactivation and Capacitation As Parths of An Oxidative Process; *Free Radical Biology & Medicine* 14; 157 - 166
- De Lamirande. E and C. Gagnon, 1994. Reactive oxygen species (ROS) and reproduction.; *Adv. Exp Med. Biol.* 366; 185 - 197
- De Lamirande. E and C. Gagnon, 1995. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Rad. Biol. Med.*, 18: 487 - 495
- De Lamirande. E., H. Jiang, A. Zini, H. Kodana and C. Gagnon, 1997. Reactive Oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* Januari; 2 (1) : 48-54

- Dhindsa, J.S., K.S. Sidhu and S.S. Guraya, 1995. Induction of buffalo (*Bubalus Bubalis*) sperm capacitation and acrosom reaction in the encised reproductive tract of hamsters, *J. Theriogenology* 44 : 559 – 608
- Ding, D.C.S.M. Liou, L.Y. Huang, J.Y. and G. J. Wu, 2000. Effects of four methods of sperm preparation on motion characteristics and nitric oxide concentration in laboratory – prepared oligospermia. *J. Zhonghus Taipei* (11) : 822 – 7
- Donnelly ET, N. McClure and S.E. Lewis, 1999. The effect of ascorbate and alpha – tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide – induced DNA damage ion human spermatozoa. *Mutagenesis*, Sep. 14 (5) : 505 – 12
- Dorota, S. and M. Kurpisz, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Journal Reproduction Biology and Endocrinology*, March 2: 12; 1 - 7
- Douard, V. D. Hermier and E. Blesbois. 2000. Changes in Turkey Semen Lipids During Liquid in vitro Storage, *Journal Biologi of Reproduction* 63, 1450 - 1456
- Dow, M.P.D. and B.D. Bavister. 1989. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Research* (23): 171 – 180.
- Duru N.K., M. Morsheid and S. Oehninger. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 74; 1200 - 1207
- Ericsson R.J. and R.H. Glass. 1987. Functional differences between sperm bearing the X and Y – chromosome. In *Prospects for sexing mammalian sperm*. Editor R.P. Amann and G.E. Seidel. Colorado Assoc University Press. Boulder 201 - 202
- Evans W.H. and J.M. Graham, 1989. *Membrane structure and function*. IRL Press . oxford University Press. Oxford. Pp. 11 – 28
- Flaherty CM., N.B. Borlequi and M.T.Beconi, 1999. Reactive oxygen species requiremants for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*, July; 15 : 52 (2) : 289 – 301
- Fraga, C.G., Motchnik, P. A. , Shigenaga, M.K., 1991. Ascorbic acide protect afgaints endogenous oxidation DNA damage in human sperm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88; 11003 -11006

- Fraga, C.G., Motchnik, P. A. , Wyrobek, A.J. and Shigenaga, M.K., 1996. Smoking and low antioxydant levels increase oxidation damage to sperm DNA. *Mutat. Res.*, 351, 199 - 203
- Gomes E., D.S. Irvine and R.J. Aitken, 1998. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa; relationships with semen quality and sperm function. *Int. J. Androl.* 21: 81 - 94
- Goyal, R.L., R.K. Tuli, G.C. Georgie and D. Chand. 1996. Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or sephandex filtration. *Theriogenology*, 46 : 679 – 686
- Grant, S.A., Long, S.E. and Parkinson, T.J. 1994. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by percoll gradient centrifugation, *J. Reproduction and Fertility* 100 : 477 – 483
- Griveau, J.P., E.Dumont, P. Renard, J.P. Callegari and D. Le Lennou, 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymic defence system in human spermatozoa. *Jour. Of Reprod. And Fertility* 103: 17 - 26
- Griveau, JP and D. Le Lannou, 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa; physiology and pathology. *Int J Androl*, 20; 61 – 69.
- Gutteridge J.M.C, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem* 41 (12): 1819 -1828
- Guzman, E.G., M. Ollero, M.C. Lopez, R.K. Sharma, J.g. Alvarez, A.J. Thomas and A. Agarwal. 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod.* Vol. 16.9. : 1922 – 1930
- Hardjopranojoto, S. 1983. Biologi Reproduksi Kerbau Lumpur (Bubalus Bubalis) ditinjau dari segi kesuburan, hormon kelamin, morfologi kelenjar hipofisa dan spermatozoa. Disertasi Pascasarjana IPB Bogor
- Hafez, E.S.E. 1993 Spermatozoa and seminal plasma dalam *Reproduction in Farm Animal*, 6th ed. Lea & Febiger Philadelphia, USA pp 166 – 188

- Hafez, E.S.E. 1993 Fertilization, Cleavage and Implantation dalam *Reproduction in Farm Animal*, 6th ed.. Lea & Febiger Philadelphia, USA pp 188 – 213
- Hafez, E.S.E. 2000. X- and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa dalam *Reproduction in Farm Animal*, 7th ed. Lea & Febiger Philadelphia, USA pp 440 – 446
- Halliwell, B. 1993. Free radicals and vascular disease; how much do we know? *Brit Med. J.* 307; 885
- Halliwell, B and J.M.C.Gutteridge, 1999. Free radicals in *Biology and Medicine*. Third edition, Oxford : Oxford University Press, pp: 1 – 35, 246 – 350; 664 – 667.
- Hammerstedt, H.R., 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation : A review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 5 : 675 – 690
- He, L., J.L. Bailey and M.M. Buhr. Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential. *Journal Biology of Reproduction* 64 : pp 69 – 79
- Herdis, 1998. Metode pemberian gliserol dan lama ekuilibrasi pada proses pembekuan semen kerbau lumpur, Thesis Pascasarjana IPB, Bogor
- Herrero M. B., E. de Lamirande and C. Gagnon, 1999. Nitrit oxide regulates human sperm capacitation and protein tyrosine. *Bio of Reprod.* 61 hal; 575 - 581
- Hossepien de Lima, V.F.M., M.D.T. Ramaldo, L.H. Rodrigues, E.B. Malheiros and C.A. Moreira – Filho, 1999. Separation of X-and Y-bearing buffalo spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. *Theriogenology.* 53; 479 – 80
- Hughes CM., Lewis SE., McKelvey – Martin VJ. and Thompson W. 1998. The effects of antioxidant supplementation during percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.* May. 13 (5) : 1240 – 7
- Huszar G. and L. Vigue. 1993. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol. Reprod Dev.* 34; 292 - 298

- Huszar G. and L. Vigue. 1994. Correlation between the rate of lipid peroxidation and celluler maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J. Androl*, 15; 71 – 77
- Iwasaki A and Gagnon C. 1992. Formation of reactive oxygen spesies in spermatozoa of infertile patient. *Fertil. Steril.* 57; 408 – 416
- Johnson, L.A., Welch G.R., Kayvan, F. Darfman, A. Fugger E.F. and Schulman J.D. 1993. Gender pre selection in human, Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases human reproduction 8 : 10 : 1733 – 1739
- Jones, R.T. Mann and R.J. Sherins, 1993. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids, *J. Reprod. Fertil.* 50 : 261 – 268
- Kaneko, S.,J. Yanagimachi, T. Kobayashi, and R. Lizuka, 1983. Separation of human X and Y Bearing sperm using percoll density gradien centrifugation, *Fertil and Steril*, 40
- Keiso, K.A. A. Redpath, R.C. Noble and B.K. Speake, 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bull. *Journal or Reproduction and Fertility.* 109 : 1 – 9
- Kumar, N., G.R. Pangawar and R. Kumar. 1991. Effect of filtration on seminal plasma electrolytes in bufallo bull. *Indian Vet. J.* 68 : 498 – 494
- Kobayashi, H., E. Gil-Gulman, A.M. Mahra, R.K. Sharma, D.R. Nelson and A.J. Thomas, 2000. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *J. Androl* 22, 568 - 574
- Kobayashi, J., H. Sasada and E. Sato, 2003. Identifying gender of Gametes in cattle. *Animal Frontier Sciences.* Pp: 31 - 36
- Koopman P., 1995. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammal. *Reprod. Fertil. Dev.* 7; 713 - 722
- Mahaputra, I. L., I. Mustopo, S. Utama dan A. Hinting, 1998. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya, dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi perah. Laporan Penelitian Hibah Bersaing III / 3

- Mahaputra, I. L., R. Emawati dan D. Simorangkir, 1999. Pembuatan embrio jantan dan betina secara terpisah serta pengembangan cell line sebagai pemicu pertumbuhan dengan pengetahuan teknik bayi tabung pada sapi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/1
- Mates M.J., and F.S. Jimenz, 1999. Antioxidant enzymes and their implication in pathophysiologic process. *Frontiers in Bioscience* 4; 399 - 345
- Mc. Clure R.D., Nunes L. and Tom R., 1989. Semen manipulation : improved sperm recovery and function with a two layer percoll gradient. *Fertil. Steril.* 515 : 5 - 11
- Mirajuddin, 1997: Pengaruh Preparasi sperma dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll dan swim-up terhadap kualitas spermatozoa dan angka konsepsi pada kambing penaranakan etawah. Thesis Pasca sarjana Universtas Airlangga, Surabaya.
- Nainar, M.A., B.M. Easwaran dan V. Ungathan. 1991. Studies on non-motile spermatozoa (static semen) in buffalo bull semen. *Indian Vet. J.* 67 : 133 - 135
- Ollero, M, Powers R.D., Alvarez J.G. 2000. Variatiopn of docoxahexanoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implication for sperm lipoperoxidative damage. *Mol. Reprod Develop* 55; 326 - 334
- Ollero, M., E. Guzman, M. C. Lopez, R. K. Sharma, A. Agarwal, K. Larson, D. Evenson, A. J. Thomas and J. G. Alvarez. 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *J. Human Reprod.* Vol. 16; No.9 pp. 1912 -1921
- Orrenius S, 1993. Mechanism of oxidative cell damage. In (Poly G. Albano E and Dianzani MU eds) *Free radicals : From Basic Science to Medicine, Switzerland; Birkhauser Verlag* pp; 47 - 64
- Parrish, J. J. and First 1993. Capacitation, Acrosom reaction and fertilization in G. J. King (ed.) *Reproduction in domesticated animals.* Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam pp 195 - 227
- Parks, J.K., J.W. Arion and R.H. Foote, 1987. Lipid of plasma membrane and outer acrosomal membranes and membrane leaflets. *Journal Biol Reprod*, 37 : 1249 - 1258

- Park, J.E. and J.K. Graham, 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes, *J. Therigenology* 38 : 209 – 222
- Phelps, M. J., J. Liu, J.D. Benson, C.E. Willoughby, J.A. Gilmore and J.K. Critser, 1999. Effect of Percoll Separation, Cryoprotective Agent, and Temperature on Plasma Membrane Permeability Characteristics of Murine Spermatozoa and Their Relevance to Cryopreservation. *Journal Biol. Reprod* 61; pp 1031 – 1041
- Purohit, S.B., M. Laloraya and G.P. Kumar. 1999. Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa, *Asian J. Androl Sep* : 1 : 95 – 107
- Quinlivan, W.P. and G. Sullivan, 1982. Separation of human X and Y spermatography, *Fertil. Steril*, 37
- Safei, S. 1990. Pemisahan spermatozoa X dan Y dengan memakai percoll, Dari hati sampai ke mata disunting oleh Jamal. Pusat Penelitian Universitas Andalas
- Saleh. R.A., A. Agarwal, E. A. Nada, M.H. El-Tonsy, R.K. Sharma. A. Meyer. D. R. Nelson and A. J. Thomas. 2003. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility*, vol. 79' 1597 -1605
- Sakkas D., G.C. Manicardi, M. Tomlison, M. Madrioli, D. Bizzaro, P.G. Bianchi and U. Bianchi. 2000. The use of two density gradient Centrifugation techniques and the swimp – up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction*. May; 15 (5): 112 – 6
- Sanocka, D. and M. Kurpisz, 2004. Reactive oxygen species and sperm cell, *J. Reproductive biology and Endocrinology*. 2004. 2: 12 -19
- Seidel, G.E., 1988. Commercializing reproductive biotechnology the approach used by xy. inc. *J. Therigenology* 51 : 5
- Sengupta, B.P. and S.L. Bhela. 1988. Current status of male fertility research in buffaloes. *Buffalo Production and Health. A Compendium of Latest Research Information Based on India Studies*. India Council of Agricultural Research Krishi Anusandhan Bhavan, Pusa, New Delhi. 63 – 88.

- Sharma, R.K., F.F. pasqualotto D.R. Nelson dan A. Argawal, 1999. The reactive oxygen species – total antioxydant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.* 14; 2801 – 2807
- Shekamiz M., A.J. Thomas and A. Agarwal. 1995. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol* 28: 31 – 35.
- Sikka S.C., M. Rajasekaran and W.J.G. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl* 16; 464 – 468
- Sikka S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci*, 1: 78 – 86
- Sikka S.C., M. Rajasekaran, W. Chamulitrat, P. Gatti, W.J. Hellstrom and J. S. Armstrong 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 869 – 880
- Sikka, S.C. 2000. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med. Chem*, 8: 851 - 850
- Singh, R.S., N.S. Tomar, K.C. Sharma and K.B. Sharma. 1992. Studies on acrosomal abnormalities of cattle and buffalo in relation to other semen characteristic and fertility, *Indian Vet. J.* 69 : 267 – 268
- Singh, P., D. Chand and G.C. Georgic. 1992. Lipid peroxydation influence on release of glutamate oxaloacetate transaminase, free fatty acid and fructolytic index of buffalo (*Bubalus Bubalis*) spermatozoa. *Indian Vet. J.* 69: 718 – 720
- Singh, D. M.K. Sharma and R.S. Panday. 1998. Changes in superoxyde dismutase activity and estradiol –17 β content in follicles of different size from ruminants. *Indian J. Exp Biol.* 36: 358 – 360
- Sjodin B. Y. Hellsten and F.S. Apple. 1990. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sport Medicine* 10 (4); 236 – 245
- Situmorang, P., 1995. daya hidup spermatozoa kerbau Lumpur, kerbau sungai dan persilangan setelah dibekukan pada nitrogen cair. *Ilmu dan Peternakan* 6: 6-10

- Sodergren, E. 2000. Lipid Peroxidation in vivo, Evaluation and Application of Methods for Measurement. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala*
- Suryohudoyo, P. 1995. Oksidan, anti – oksidan dan radikal bebas dalam Simposium dampak negatif radikal bebas pada organ tubuh dan manfaatnya antioksidan. Fakultas Kedokteran Unair, Surabaya
- Suryohudoyo, P. 2000. Ilmu Kedokteran Molekuler. Cetakan Pertama, Jakarta; CV. Sagung Seto. Hal 31 - 47
- Susilawati, T., S.B. Sumitro dan H. Sutanto. 1996. Upaya Pembekuan Semen Hasil Sexing Penerapannya dalam Inseminasi Buatan Pada Sapi Untuk Mendapatkan Pedet dengan jenis Kelamin Sesuai Harapan. Laporan Penelitian RUT. Universitas Brawijaya Malang.
- Susilawati, T. S.B. Sumitro dan H. Sutanto. 1998. Uji Viabilitas Embrio Hasil Fertilisasi In vitro dengan Sperma Hasil Sexing. Laporan Akhir Penelitian Hibah Bersaing VI. Universitas Brawijaya Malang.
- Susilawati, 2000. Analisis memberan spermatozoa sapi hasil filtrasi sephadexs dan sentrifugasi gradien densitas percoll pada proses seleksi jenis kelamin. Disertasi Pascasarjana Unair Surabaya
- Sudjarwo, 2000. Korelasi senyawa oksigen reaktif dengan kualitas semen manusia; *Majalah Kedokteran Indonesia*; Vol. 50. No. 10: Oktober 456 – 459
- Sudjarwo, 2001. Peran Mitokondria pada fungsi Spermatozoa. Disertasi Pascasarjana Unair Surabaya.
- Tanphaichitr, N. Y.S. Zheng, M. Kates, N. Abdullah and A. Chan. 1996. Cholesterol and Phospjoliipid levels of washed and percoll gradien Centrifuged mouse sperm. Presence of lipids possessing inhibitory effects on sperm motility. *Mol. Reprod Dev* , 43: page 187 - 195
- Tatham, B.G. D.P. Bayard and G.A. Jayawardhana, 2000. The effect of varius extenders on post thaw motility of buffalo semen. *Proc Aust. Soc. Reprod Biol.*
- Tatham, B.G. 2000. Increasing Buffalo production using reproduction technology, a report for the rural industries research and development Corporation.

- Thaher, C.D., and R.A. Cardullo. 1995. The mammalian sperm surface: molecular and cellular aspects in *Gametes the spermatozoon*, Ed. J.G. Grudzinskas and J.L. Yovich. Cambridge
- Toelihere, M.R. 1985. Inseminasi Buatan pada temak. *Angkasa*. Bandung Hal 92 – 120
- Toelihere, M.R. 1998. Recent development in artificial breeding programs. Seminar on Livestock AI Program. Bogor 16 to 20 Februari. Indonesian DGLS and APO
- Travis, A. J and G.S. Kopf. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa, *Biology and biochemistry of cholesterol* Vol. 10 No. 6. Pp 731 – 736
- Uchiyama M and Mihara M., 1998. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thyo barbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271 - 278
- Ukeda. H. 2000. Assay of enzyme superoxyde dismutase. *Dep. Agric. Khochi university Monobe Otsu Nangoku-City. Khochi*, pp. 783 - 850
- Valcarcel, A., M.A. de las Heras, L. Peres, D.F. Moses and H. Baldassarre, 1994. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post thawing survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, 41: 269 - 278
- Watkins, A.M., P.J. Chan, W.C. Patton, J.D. Jacobson and A. King, 1996. Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous percoll gradient for sex preselection: Computerized analyses. *Arch Androl*, Jul – August; 37 (1); pp 1 – 5
- Wasserman, P.M., 1994. Mammalian Fertilization : Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion, *Cell* 96 : 175 - 83
- Widodo M.A., 2003. Calcium dan Generasi Spesies Oksigen Reaktif pada fungsi mitokondria. *Basic molecular Biology course on mitochondrial medicine*; 1 – 2 Agustus; 15 - 31
- Wijaya, A. 1996. Radikal bebas dan parameter statur antioksidan. *Forum Diagnostikum Prodia Diagnostics Education Services*. Pp. 1 – 12
- Wu, D.E, S.S. Hagopian and S. Ishijima. 1986. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in mouse. *J. Cell Biol* 102 ; 1372 – 1377

- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian Fertilization. In: Knobil E., Neill JD (eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York; Raven Press Ltd; 189 - 318
- Yeagle PL. 1994. Lipid and lipid-intermediate structures in the fusion of biological membrane. *Curr top membr* 4: 197 - 214
- Yuliani E. 2000. Pemisahan spermatozoa dengan metode swim-up dan kombinasi swim-up dengan aside migration dan pengaruhnya terhadap rasio kromosm seks. Disertasi Pascasarjana Unair Surabaya
- Yong Xu, Ho, C., Amin, S., Han, C and Chung, F. 1992. Inhibition of Tobacco specific nitrosamine – induced lung tumorigenesis in A/J Mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants; *Cancer Research*; 52 July; 3875 – 3879
- Visconti P. E. G.S. Kopf. 1998. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Minireview Biology of Reproduction* 59; pp 1 – 6
- Visconti P. E., H.G. Homer, XiaoPing Ning, G.D. Moore, J.P. Valenzuela, C. J. Jorgez, J.G. Alvarez and G.S. Kopf. 1999. Cholesterol Efflux-mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274. No. 5, Pp. 3235 – 3242
- Zini A., E. de Lamirande and C. Gagnon. 1995. Low levels of nitric promote human sperm capacitation in vitro, *J. Androl* 16: 424 – 431.
- Zini, A. Nam, R.K., Mak, V., Phang, D. and Jarvi, K. 2000. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertil Steril* 74 (4) : 824 – 7.

Lampiran 1. Pembuatan reagensia

1.a. Larutan Na CL fisiologis 0,9 %

Ditimbang 4,5 gram NaCl, 0,03 gram penicillin, 0,05 gram streptomisin dilarutkan dengan aquadest dalam beker glass 50 ml. kemudian dituangkan ke labu ukur 500 ml dan diencerkan sampai volume tanda batas.

1.b. Larutan PBS.

Timbang 4.0 gram NaCl, 0,1 g KCl, 1,45 g Na₂HPO₄; 0,1 g KH₂PO₄; 0,03 g penisilin; 0,05 g streptomisin dilarutkan dengan aquades steril dalam beker glass 50 ml. Kemudian tuangkan ke labu ukur 500 ml dan encerkan sampai tanda batas

1.c. Pembuatan Media Earle' Balance Sal Solution (EBSS)

Komponen	g/liter
Calcium Chloride. 2H ₂)	0,265
Magnesium Sulfat	0,09767
Potassium Chloride	0,4
Sodium Chloride	6.8
Sodium Phosphst Monobasic	0,122
D-Glucosa	1.0
Phenol Red. Na	0,011

Medium Pencucian Spermatozoa

Komponen	100 ml/mg
EBSS Stock	0,87
BSA	1,25
Pyruvat 1 %	0,10
Gentamisin	25 ug/ml
T. Beker	100 ml

1.d. Larutan Hypoosmotik Swelling Test

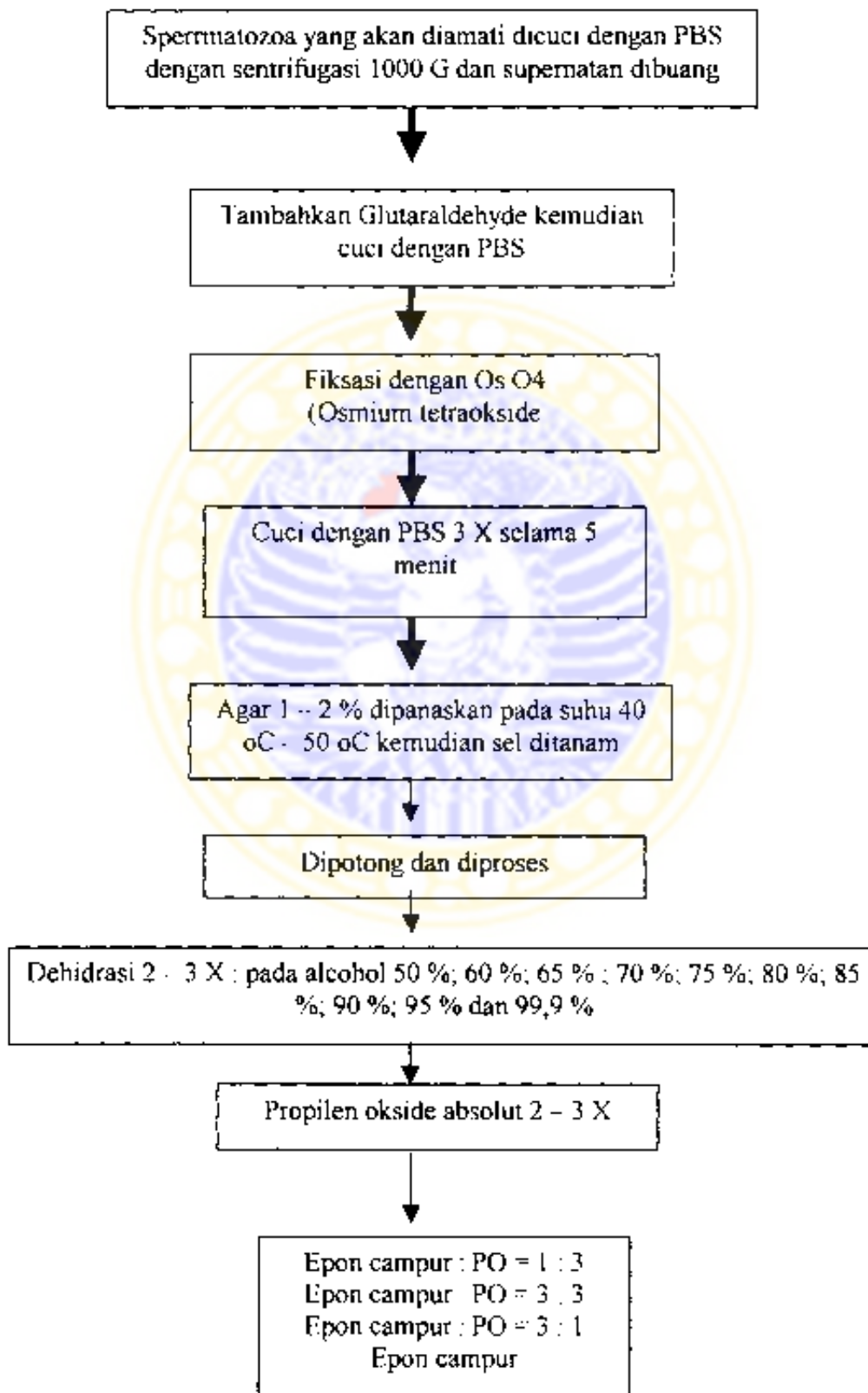
Timbang 7,35 g Natrium sitrat 2H₂O, 13,52 g fruktosa dan larutkan dalam 1 liter aquadest. Kemudian inkubasikan selama 1 jam dalam penangas air pada suhu 37 oC.

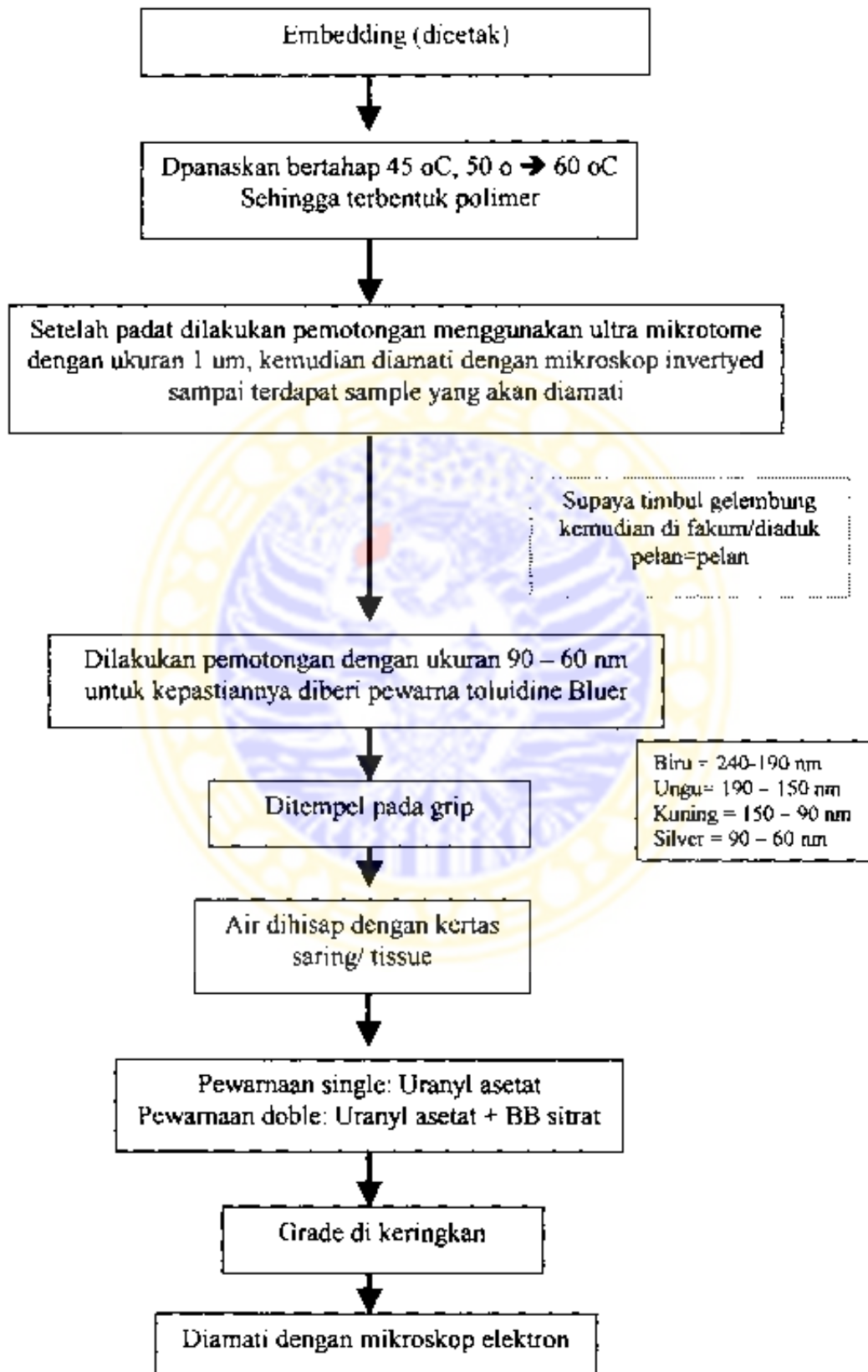
1.e. Larutan Pemeriksaan Tudung Akrosom

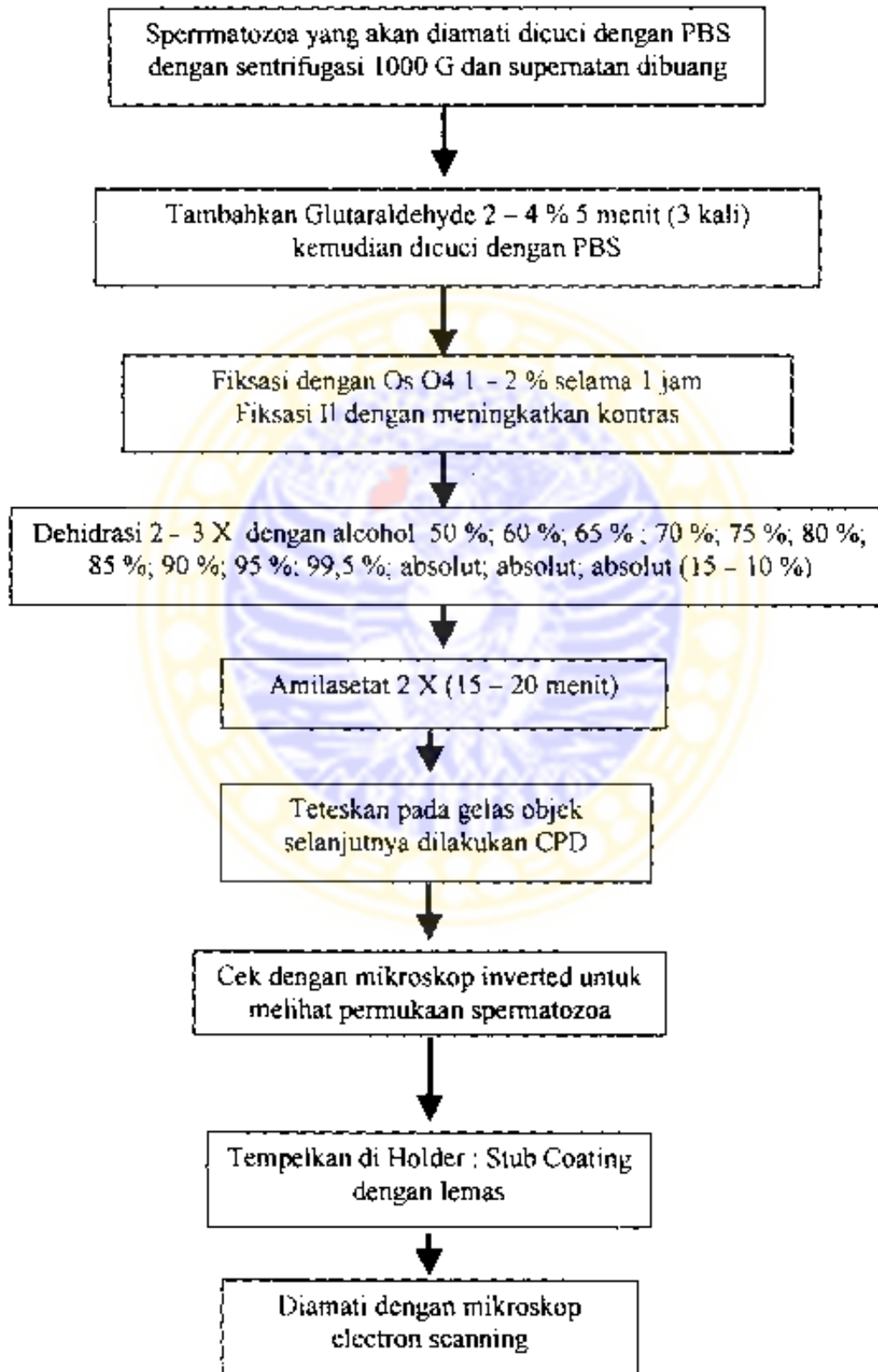
Timbang 0,9 g Na Cl dan larutkan dalam aquadest sampai mencapai 1 00 ml. Tambahkan dengan 1 ml formalin ke dalam 99 ml larutan Na Cl fisiologis, kocok sampai homogen. Simpan dalam refrigerator sampai digunakan

LAMPIRAN 2. Bagan Pemeriksaan Ultrastruktur spermatozoa dengan menggunakan mikroskop electron Transmisi

1





LAMPIRAN 3. Bagan Pemeriksaan Ultrastruktur spermatozoa dengan menggunakan mikroskop elektron Scanning

Lampiran 4 : Prosedur Pemeriksaan ROS dengan Metode Chemiluminicence

Prosedur Kerja

- Sebanyak 400 μl suspensi sperma dari setiap kelompok perlakuan, ditambahkan 4 μl (25 mM luminol dalam *dimethylsulphoxide* /DMSO dengan konsentrasi akhir 250 μM) dan tambahkan dengan 8 μl *horseradish peroksidase* (2 mg/ml PBS), lalu vortex 30 detik. Selanjutnya masuk tbung afindofr tersebut dalam tabung khusus dan tempatkan pada rak beta counter.
- Pengukuran kadar ROS dilakukan selama 1 menit dengan menggunakan *Berthold luminometer*. Nilai ROS diekspresikan sebagai 10^6 photon yang dihitung per menit (CPM) per ml sperma atau dibagi dengan konsentrasi spermatozoa (1×10^8 spermatozoa).

Contoh perhitungan kadar ROS spermatozoa

No	Lart	Jumlah
1	Luminol	4 ul
2	Horse Radish Peroksidase	8 ul
3	Sampel sperma	400 ul
	Jumlah	412 ul

Kadar ROS/ml sperma adalah ;
 $= 1000 / 412 \times \text{nilai betacounter/ml sperma}$
 $= 2,427 \times \text{nilai beta counter /ml sperma}$

Misal nilai beta counter : 4,48

Maka kadar ROS spermatozoa adalah; $= 1000 / 412 \times 4,48$

$$= 2,427 \times 4,48 \rightarrow 10,89 \text{ CPM/ml sperma}$$

$$= 10,89 \text{ CPM/ml sperma ; } 2,14$$

$$= 5,09 \text{ CPM / ml/}10^8 \text{ spermatozoa}$$

Lampiran 5 : Prosedur Kerja Pemeriksaan Kadar Malonaldehyde (MDA)

Prinsip:

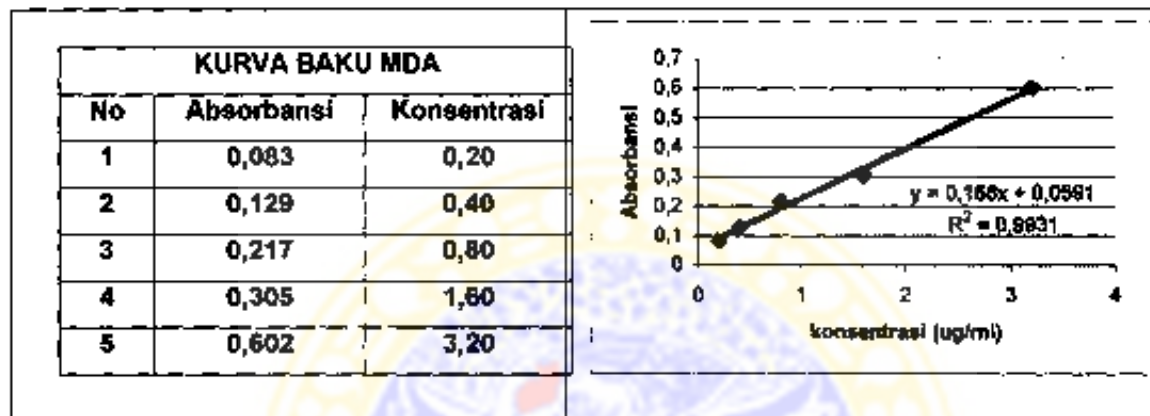
Uji ini menggunakan warna sebagai indikator. Dalam suspensi spermatozoa terdapat protein yang dapat bereaksi dengan asam thiobarbiturat, sehingga suspensi spermatozoa terlebih dahulu ditambahkan dengan asam trikloroasetat yang berfungsi untuk mengendapkan protein dan kemudian disaring. HCl berfungsi untuk memberikan suasana asam sehingga natrium thiobarbiturat diubah menjadi asam thiobarbiturat. MDA akan bereaksi dengan asam thiobarbiturat menjadi senyawa keunguan yang dapat dideteksi absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 529 nm. Kadar MDA ditentukan dengan interpolasi pada kurva baku

Prosedur Kerja

- Sebanyak 100 ul ml suspensi spermatozoa dari masing-masing perlakuan, dipisahkan dari proteinnya dengan penambahan 100 ul asam trikloroasetat 20 % lalu divorteks, lalu tambahkan 250 ul HCL 1N dan 100 ul natrium thiobarbiturat 1 % serta aquadest 450 ul atau sampai volume akhir 1 ml. Selanjutnya panaskan dalam *water bath* pada suhu 100 °C selama 20 menit atau sampai terlihat berwarna pink
- Kemudian sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, ambil supernatannya sebanyak 800 ul dan masukan dalam tabung lain, tambahkan dengan aquadest 1200 ul atau sampai volume akhir 2 ml. Baca serapannya dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 529 nm. Sebagai kontrol dilakukan perlakuan yang sama tetapi dengan cara menambahkan MDA standar dengan konsentrasi berbeda.
- Penilaian kadar MDA dilakukan dengan cara mengkompersikan nilai hasil pengukuran absorbansi dengan kurva baku standar, selanjutnya dikali

dengan pengenceran dan bagi dengan berat molekul MDA. Kadar MDA diukur berdasarkan jumlah nmol MDA pada setiap ml suspensi semen (Alvarez and Storey, 1995).

Contoh perhitungan kadar MDA



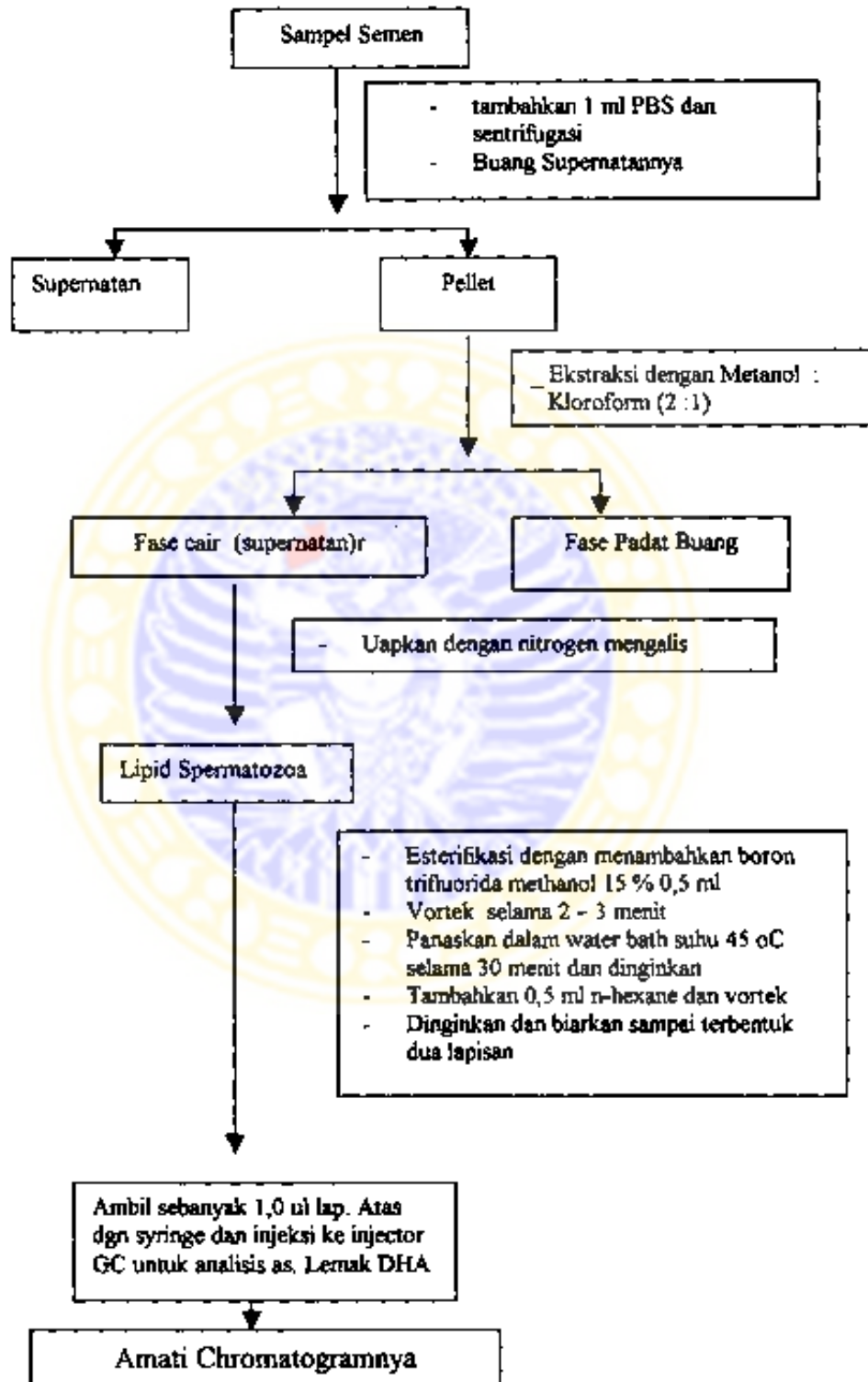
Bila nilai absorbansi sampel spermatozoa didapat adalah 0,114

Y = nilai absorbansi

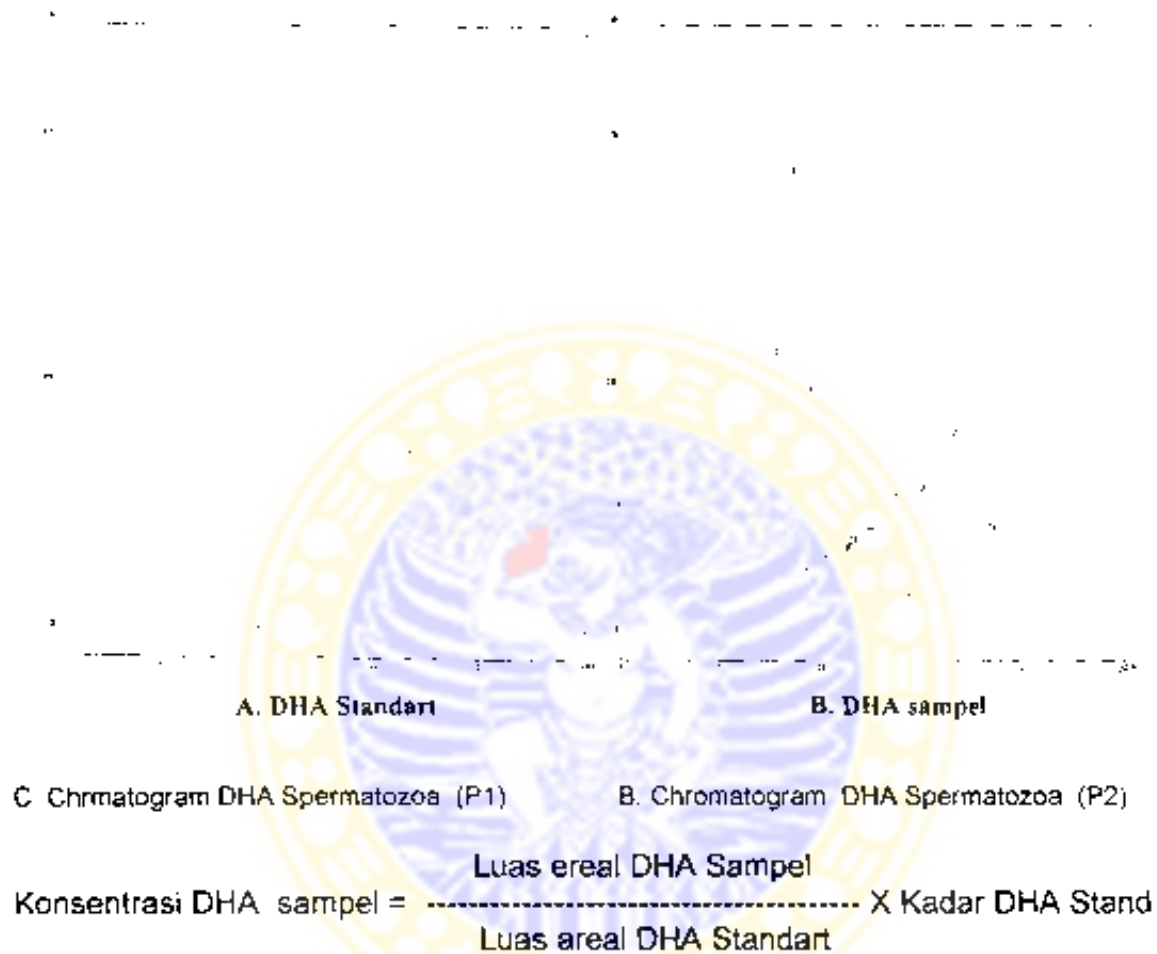
X = nilai kadar MDA

$$\begin{aligned}
 Y &= 0,168 X + 0,0591 \\
 0,114 &= 168 X + 0,0591 \\
 X &= 0,114 - 0,0591 / 0,168 \\
 &= 0,0549 / 0,168 \\
 &= 0,327 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} \\
 &= 0,654 \mu\text{g} \approx 800 \mu\text{l} (\approx \text{Eq dalam 1 ml sampel}) \\
 &= 1000/800 \times 0,65357 \mu\text{g} \\
 &= 0,817 \mu\text{g/ml} \approx 100 \mu\text{l} (\approx \text{Eq dalam 1 ml sampel}) \\
 &= 1000/100 \times 0,817 \mu\text{g/ml} \\
 &= 8,169 \mu\text{g/ml} \\
 &= 8,169 \mu\text{g} / 2,14 \times 10^8 \text{ spz} \\
 &= 3,818 \mu\text{g} / 10^8 \text{ spermatozoa} \\
 &= 3,818 \mu\text{g} / 10^8 \text{ spermatozoa} / \text{BM MDA (164,2)} \\
 &= 0,02325 \mu\text{mol} / 10^8 \text{ spermatozoa} \\
 &= 23,25 \text{ nmol} / 10^8 \text{ spermatozoa}
 \end{aligned}$$

Lampiran 6. Skematis Pemeriksaan profil Spermatozoa



Hasil prin out Chromatogram asam lemak membran spermatozoa kerbau lumpur dengan menggunakan Gas Chromatografy



$$\text{Konsentrasi relatif DHA sample} = \frac{63592}{7165746} \times 0,025 \text{ mg/ul (25 ug/ul)}$$

$$\text{Konsentrasi relatif DHA} = 0,0088744 \times 25 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l} = 0,22186 \text{ ug/ul}$$

$$\begin{aligned} \text{Jadi Kadar DHA / ml sperma} &= \text{Konsentrasi DHA} \times \text{Faktor Pengencer} \\ &= 0,22186 \text{ } \mu\text{g} \times 500 \text{ } \mu\text{l} \\ &= 110,93 \text{ } \mu\text{g} / \text{ml} \end{aligned}$$

$$\text{Jadi Kadar DHA / } 10^8 \text{ spz} = 110,93 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml} ; 2,14 = 51,836 \text{ } \mu\text{g}/10^8 \text{ spz}$$

$$\text{atau} = 51,836 \text{ ug}/10^8 \text{ spermatozoa}$$

Lampiran 8 : REKAPITULASI KUALITAS SEMEN SEGAR KERBAU LUMPU HASIL PENAMPUNGAN

No	PARAMETER SIFAT FISIK SEMEN SEGAR KERBAU LUMPU								
	Vol (ml)	Warna	Kons	Kont (10 ⁷)	pH	Mol a+b (%)	Via (%)	Abu (%)	MPU (%)
1	1.8	p.susu	Agak kent	112	6.8	84	88	8	84
2	2,6	P.susu	Agak kent	134	7.0	80	87	7	86
3	2.4	p.susu	Agak kent	125	6.7	78	83	8	79
4	3.1	p.susu	encer	98	6.5	80	84	10	84
5	2.5	p.susu	Agak kent	107	6.8	70	87	7	86
6	2,2	p.susu	Agak kent	110	7.2	75	90	8	83
7	2.8	p.susu	encer	84	6.8	80	92	12	80
8	3.0	p.susu	Agak kent	76	6.2	78	88	6	86
9	2,2	p.susu	Agak kent	112	6,4	80	87	7	83
10	2,4	p.susu	Agak kent	129	7,2	77	90	8	76
11	3,7	p.susu	Agak kent	132	7,0	80	88	13	84
12	2,3	p.susu	Agak kent	116	6,8	76	86	8	86
13	2,6	p.susu	Agak kent	107	7,2	75	85	7	68
14	2,4	p.susu	Agak kent	118	7,0	72	88	8	73
15	3,1	p.susu	Agak kent	130	7,0	80	87	14	81
16	2,5	p.susu	Agak kent	87	6,4	78	89	5	78
17	2,3	p.susu	Agak kent	121	6,8	75	84	11	80
18	2,4	p.susu	Agak kent	118	7,0	70	85	8	74
19	2,6	p.susu	Agak kent	123	6.6	84	90	13	80
20	2,3	P.susu	Agak kent	120	7.0	82	86	7	82
X	2,48	-	-	1128,00	6,75	76,43	86,76	12,34	82,55
SD	0,47			189,11	0,12	3,50	2,60	4,12	3,90

Lampiran 9 : Rekapitulasi Data Penelitian Pemisahan Spermatozoa Kerbau Lumpur dengan Sentrifugasi Gradien densitas Percoll

Kode	Konst10 ⁶	% Kualitas Spermatozoa		% Kapasitas & R.A			ROS Cpm/10 ⁶ sp	MDA nmol/ml/ 10 ⁶ sp	Profil Lipid	
		Motilitas	MPU	TK	Kp	R.A			T.Kol (ug/10 ⁶ sp)	DHA (ug/10 ⁶ sp)
K-1	2,14	76	85	96	4	0	5,09	23,30	3,26	15,13
K-2	1,98	78	80	93	6	1	8,56	37,98	3,76	14,38
K-3	2,05	75	76	95	5	0	7,08	20,34	4,30	15,65
K-4	2,11	77	78	91	8	0	8,25	32,71	2,87	12,93
K-5	1,05	80	83	93	6	1	3,72	08,28	3,28	07,98
K-6	2,05	76	76	94	5	1	7,33	19,02	4,11	11,50
K-7	2,07	78	78	92	8	0	4,68	10,53	3,57	19,11
K-8	2,02	80	80	93	7	0	5,98	14,80	2,54	10,81
Jml	16,182	620,00	636,00	747,00	49,00	3,00	50,72	166,96	27,69	107,52
Rata	2,0213	77,50	79,50	91,13	6,13	0,375	6,34	20,87	3,46	13,44
SD	0,993	1,85	3,21	6,31	1,46	0,517	1,75	10,32	0,59	3,41
P1-1	1,49	72	62	38	58	4	11,37	27,99	2,06	6,09
P1-2	1,28	77	47	29	64	7	17,99	48,19	2,69	8,95
P1-3	1,34	75	56	40	57	3	12,81	25,72	2,91	6,26
P1-4	1,49	74	50	28	65	7	26,79	44,43	2,86	6,72
P1-5	1,26	76	58	42	54	3	10,94	15,77	3,02	7,57
P1-6	1,37	78	53	36	59	5	13,44	39,71	2,92	9,33
P1-7	1,36	73	52	30	64	6	09,26	23,33	2,84	6,17
P1-8	1,28	77	48	27	65	8	12,66	31,17	2,24	8,89
Jml	10,636	602,00	426,00	287,04	486,00	43,00	115,26	263,44	21,55	59,98
Rata	1,3252	75,25	53,25	35,88	60,75	5,375	14,41	32,93	2,69	7,49
SD	0,0779	2,12	5,15	9,06	4,27	1,92	5,61	11,35	0,35	1,37

Kode	Konst 10 ⁶	Kualitas Spermatozoa		Kapasitasi & RA			ROS Cpm/10 ⁸ sp	MDA nmol/ 10 ⁸ sp	Profil Lipid	
		Motilitas	MPU %	TK %	Kp %	RA %			T.Kol (ug/10 ⁸ sp)	DBA (ug/10 ⁸ sp)
P2-1	1,52	70	45	24	69	7	20,69	35,18	1,96	5,15
P2-2	1,43	75	41	21	67	12	18,60	45,02	1,99	6,65
P2-3	1,46	73	55	28	65	7	13,25	29,19	2,41	6,84
P2-4	1,50	77	46	24	67	9	45,17	52,59	2,31	5,96
P2-5	1,38	74	53	36	59	5	10,52	30,22	2,12	6,63
P2-6	1,30	75	47	27	65	8	16,76	46,74	2,55	4,36
P2-7	1,34	70	50	31	62	7	11,88	26,39	2,13	6,00
P2-8	1,29	73	43	22	72	6	14,99	33,04	1,96	6,95
Jml	12,463	587,00	380,00	211,04	528,00	64,00	151,84	298,37	17,44	48,54
Rata	1,475	73,38	47,50	26,38	66,00	8,00	18,98	37,29	2,18	6,07
SD	0,1593	2,25	4,8	4,81	3,82	2,07	11,11	9,56	0,22	0,91

Lampiran 10. Analisis Statistik Normalitas dan Homogenitas Data

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
motilitas spermatozoa	24	75.38	2.68	70	80
viabilitas spermatozoa	24	87.13	2.42	83	92
integritas membran plasma utuh	24	60.08	14.86	41	85
kapasitas	24	44.21	27.79	4	72

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		motilitas spermatozoa	viabilitas spermatozoa	integritas membran plasma utuh	kapasitas
N		24	24	24	24
Normal Parameters ^a	Mean	75.38	87.13	60.08	44.21
	Std. Deviation	2.68	2.42	14.86	27.79
Most Extreme Differences	Absolute	.111	.109	.192	.304
	Positive	.081	.109	.192	.237
	Negative	-.111	-.104	-.191	-.304
Kolmogorov-Smirnov Z		.544	.533	.939	1.491
Asymp. Sig. (2-tailed)		.928	.939	.342	.023

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
tkl produksi ROS	24	13.2421	8.7538	3.72	45.17
MDA	24	30.3642	12.2396	8.28	52.59
asam lemak poli tak jenuh (DHA)	24	28.8171	12.1247	11.16	53.25

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		tkr produksi ROS	MDA	asam lemak poli tak jenuh (DHA)
N		24	24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	13.2421	30.3642	28.8171
	Std. Deviation	8.7539	12.2396	12.1247
Most Extreme Differences	Absolute	.199	.083	.126
	Positive	.199	.051	.126
	Negative	-.138	-.083	-.073
Kolmogorov-Smirnov Z		.976	.407	.629
Asymp. Sig. (2-tailed)		.296	.996	.823

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



Lampiran 11. Analisis Varian satu arah persentase motilitas Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Descriptives

motilitas spermatozoa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	5% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	8	77.50	1.85	.65	75.95	79.05	75	80
perlakuan	8	75.25	2.12	.75	73.48	77.02	72	78
perlakuan	8	73.38	2.45	.86	71.33	75.42	70	77
Total	24	75.38	2.68	.55	74.24	76.51	70	80

Test of Homogeneity of Variances

motilitas spermatozoa

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.229	2	21	.797

ANOVA

motilitas spermatozoa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68.250	2	34.125	7.369	.004
Within Groups	97.375	21	4.637		
Total	165.625	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: motilitas spermatozoa

LSD

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	perlakuan 1	2.25*	1.08	.049	1.09E-02	4.49
	perlakuan 2	4.13*	1.08	.001	1.89	6.36
perlakuan 1	kontrol	-2.25*	1.08	.049	-4.49	-1.09E-02
	perlakuan 2	1.88	1.08	.096	-.36	4.11
perlakuan 2	kontrol	-4.13*	1.08	.001	-6.36	-1.89
	perlakuan 1	-1.88	1.08	.096	-4.11	.36

* The mean difference is significant at the .05 level

Lampiran 12. Analisis Varian satu arah persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Descriptives

integritas membran plasma utuh

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	5% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	8	79.50	3.21	1.13	76.82	82.18	76	85
perlakuan	8	53.25	5.15	1.82	48.95	57.55	47	62
perlakuan	8	47.50	4.84	1.71	43.45	51.55	41	55
Total	24	60.08	14.86	3.03	53.81	66.36	41	85

Test of Homogeneity of Variances

integritas membran plasma utuh

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.025	2	21	.376

ANOVA

integritas membran plasma utuh

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4658.333	2	2328.167	115.994	.000
Within Groups	421.500	21	20.071		
Total	5077.833	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: integritas membran plasma utuh

LSD

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	perlakuan 1	26.25*	2.24	.000	21.59	30.91
	perlakuan 2	32.00*	2.24	.000	27.34	36.66
perlakuan 1	kontrol	-26.25*	2.24	.000	-30.91	-21.59
	perlakuan 2	5.75*	2.24	.018	1.09	10.41
perlakuan 2	kontrol	-32.00*	2.24	.000	-36.66	-27.34
	perlakuan 1	-5.75*	2.24	.018	-10.41	-1.09

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 13. Analisis Varian satu arah Akumulasi ROS Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradlen Densitas Percoll

Descriptives

tkt produksi ROS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	5% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	8	6.3363	1.7491	.6184	4.6739	7.7986	3.72	8.56
perlakuan	8	14.4075	5.6118	1.9841	9.7159	19.0991	9.26	26.79
perlakuan	8	18.9825	11.1140	3.9294	9.6910	28.2740	10.52	45.17
Total	24	13.2421	8.7539	1.7869	9.5456	16.9385	3.72	45.17

Test of Homogeneity of Variances

tkt produksi ROS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.227	2	21	.133

ANOVA

tkt produksi ROS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	656.009	2	328.004	6.225	.008
Within Groups	1106.513	21	52.691		
Total	1762.522	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: tkt produksi ROS

LSD

(I) ktp perlakuan	(J) ktp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	perlakuan 1	-8.0713*	3.6294	.037	-15.6191	-.5234
	perlakuan 2	-12.6463*	3.6294	.002	-20.1941	-5.0984
perlakuan 1	kontrol	8.0713*	3.6294	.037	.5234	15.6191
	perlakuan 2	-4.5750	3.6294	.221	-12.1228	2.9728
perlakuan 2	kontrol	12.6463*	3.6294	.002	5.0984	20.1941
	perlakuan 1	4.5750	3.6294	.221	-2.9728	12.1228

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 14. Analisis varian satu arah Kadar MDA Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Descriptives

MDA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	5% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	8	20.8700	10.3151	3.6470	12.2463	29.4937	8.28	37.98
perlakuan	8	32.9262	11.3554	4.0147	23.4329	42.4196	15.77	48.19
perlakuan 2	8	37.2963	9.5623	3.3808	29.3020	45.2905	26.39	52.59
Total	24	30.3642	12.2396	2.4984	25.1959	35.5325	8.28	52.59

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.339	2	21	.717

ANOVA

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1158.058	2	579.029	5.316	.014
Within Groups	2287.494	21	108.928		
Total	3445.552	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA

LSD

(I) kip perlakuan	(J) kip perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	perlakuan 1	-12.0562*	5.2184	.031	-22.9086	-1.2039
	perlakuan 2	-16.4263*	5.2184	.005	-27.2786	-5.5739
perlakuan 1	kontrol	12.0562*	5.2184	.031	1.2039	22.9086
	perlakuan 2	-4.3700	5.2184	.412	-15.2223	6.4823
perlakuan 2	kontrol	16.4263*	5.2184	.005	5.5739	27.2786
	perlakuan 1	4.3700	5.2184	.412	-6.4823	15.2223

*. The mean difference is significant at the .05 level

Lampiran 15. Analisis Varian satu arah Kadar DHA Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Descriptives

asam lemak poli tak jenuh (DHA)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	5% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	8	42.6137	6.7576	2.3882	36.8642	48.2633	34.73	53.25
perlakuan	8	24.5738	7.0925	2.5076	18.6443	30.5032	13.77	33.74
perlakuan	8	19.2637	6.6810	2.3621	13.6783	24.8492	11.16	29.75
Total	24	28.8171	12.1247	2.4749	23.6973	33.9369	11.16	53.25

Test of Homogeneity of Variances

asam lemak poli tak jenuh (DHA)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.049	2	21	.952

ANOVA

asam lemak poli tak jenuh (DHA)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2396.961	2	1198.480	25.571	.000
Within Groups	984.232	21	46.868		
Total	3381.192	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: asam lemak poli tak jenuh (DHA)

LSD

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	perlakuan 1	18.0400*	3.4230	.000	10.9214	25.1586
	perlakuan 2	23.3500*	3.4230	.000	16.2314	30.4686
perlakuan 1	kontrol	-18.0400*	3.4230	.000	-25.1586	-10.9214
	perlakuan 2	5.3100	3.4230	.135	-1.8086	12.4286
perlakuan 2	kontrol	-23.3500*	3.4230	.000	-30.4686	-16.2314
	perlakuan 1	-5.3100	3.4230	.135	-12.4286	1.8086

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 16. Analisa Korelasi Akumulasi Produksi ROS, Kadar MDA, DHA dan MPU Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Correlations

		tkl produksi ROS	MDA	asam lemak poli tak jenuh (DHA)	integritas membran plasma utuh
tkl produksi ROS	Pearson Correlation	1.000	.757**	-.542**	-.655**
	Sig. (2-tailed)	.	.000	.008	.001
	N	24	24	24	24
MDA	Pearson Correlation	.757**	1.000	-.527**	-.671**
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.008	.000
	N	24	24	24	24
asam lemak poli tak jenuh (DHA)	Pearson Correlation	-.542**	-.527**	1.000	.788**
	Sig. (2-tailed)	.006	.008	.	.000
	N	24	24	24	24
integritas membran plasma utuh	Pearson Correlation	-.655**	-.671**	.788**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.001	.000	.000	.
	N	24	24	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Lampiran 17. Analisis Regresi Akumulasi ROS dengan kadar MDA Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	MDA ^a	.	Enter

^a All requested variables entered.

^b Dependent Variable: tkt produksi ROS

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.757 ^a	.573	.553	5.8514

^a Predictors: (Constant), MDA

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1009.264	1	1009.264	29.477	.000 ^a
	Residual	753.257	22	34.239		
	Total	1762.522	23			

^a Predictors: (Constant), MDA

^b Dependent Variable: tkt produksi ROS

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-3.192	3.254		-.981	.337
	MDA	.541	.100	.757	5.429	.000

^a Dependent Variable: tkt produksi ROS

Lampiran 18. Analisis Regresi Akumulasi ROS dengan kadar DHA Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	asam lemak poli tak jenuh (DHA)		Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: tkt produksi ROS

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.542 ^a	.294	.262	7.5200

- a. Predictors: (Constant), asam lemak poli tak jenuh (DHA)

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	518.405	1	518.405	9.167	.006 ^a
	Residual	1244.117	22	56.551		
	Total	1762.522	23			

- a. Predictors: (Constant), asam lemak poli tak jenuh (DHA)
b. Dependent Variable: tkt produksi ROS

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	24.526	4.031		6.085	.000
	asam lemak poli tak jenuh (DHA)	-.392	.129	-.542	-3.028	.006

- a. Dependent Variable: tkt produksi ROS

Lampiran 19. Analisis Regresi Akumulasi ROS dengan persentase MPU Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	integritas membran plasma utuh		Enter

- a. All requested variables entered.
 b. Dependent Variable: tkt produksi ROS

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.655 ^a	.429	.403	6.7638

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	756.029	1	756.029	16.525	.001 ^a
	Residual	1006.493	22	45.750		
	Total	1762.522	23			

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh
 b. Dependent Variable: tkt produksi ROS

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	36.426	5.868		6.208	.000
	integritas membran plasma utuh	-.386	.095	-.655	-4.065	.001

- a. Dependent Variable: tkt produksi ROS

Lampiran 20. Analisis Regresi kadar MDA dengan kadar DHA Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	asam lemak poli tak jenuh (DHA)		Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: MDA

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.527 ^a	.278	.245	10.6332

- a. Predictors: (Constant), asam lemak poli tak jenuh (DHA)

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	958.142	1	958.142	8.474	.008 ^a
	Residual	2487.410	22	113.064		
	Total	3445.552	23			

- a. Predictors: (Constant), asam lemak poli tak jenuh (DHA)
b. Dependent Variable: MDA

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	45.704	5.699		8.020	.000
	asam lemak poli tak jenuh (DHA)	-.532	.183	-.527	-2.911	.008

- a. Dependent Variable: MDA

Lampiran 21. Analisis Regresi kadar MDA dengan Persentase MPU Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	integritas membran plasma utuh		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: MDA

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.671 ^a	.450	.425	9.2776

a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1551.914	1	1551.914	18.030	.000 ^a
	Residual	1893.638	22	86.074		
	Total	3445.552	23			

a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh

b. Dependent Variable: MDA

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	83.580	8.049		7.900	.000
	integritas membran plasma utuh	-.553	.130	-.671	-4.246	.000

a. Dependent Variable: MDA

Lampiran 22. Analisis Regresi kadar DHA dengan persentase MPU Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	integritas membran plasma utuh		Enter

- a. All requested variables entered.
 b. Dependent Variable: asam lemak poli tak jenuh (DHA)

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.788 ^a	.621	.604	7.6345

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2098.909	1	2098.909	36.011	.000 ^a
	Residual	1282.283	22	58.286		
	Total	3381.192	23			

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh
 b. Dependent Variable: asam lemak poli tak jenuh (DHA)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-9.812	6.623		-1.481	.153
	integritas membran plasma utuh	.643	.107	.788	6.001	.000

- a. Dependent Variable: asam lemak poli tak jenuh (DHA)

Lampiran 20. Analisis Regresi kadar MDA dengan kadar DHA Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	asam lemak poli tak jenuh (DHA)		Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: MDA

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.527 ^a	.278	.245	10.6332

- a. Predictors: (Constant), asam lemak poli tak jenuh (DHA)

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	958.142	1	958.142	8.474	.008 ^a
	Residual	2487.410	22	113.064		
	Total	3445.552	23			

- a. Predictors: (Constant), asam lemak poli tak jenuh (DHA)
b. Dependent Variable: MDA

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	45.704	5.699		8.020	.000
	asam lemak poli tak jenuh (DHA)	-.532	.183	-.527	-2.911	.008

- a. Dependent Variable: MDA

Lampiran 21. Analisis Regresi kadar MDA dengan Persentase MPU Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	integritas membran plasma utuh		Enter

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: MDA

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.671 ^a	.450	.425	9.2776

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1551.914	1	1551.914	18.030	.000 ^a
	Residual	1893.636	22	86.074		
	Total	3445.552	23			

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh
b. Dependent Variable: MDA

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	63.580	8.049		7.900	.000
	integritas membran plasma utuh	-.553	.130	-.671	-4.246	.000

- a. Dependent Variable: MDA

Lampiran 22. Analisis Regresi kadar DHA dengan persentase MPU Spermatozoa Kerbau lumpur kontrol dan perlakuan pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	integritas membran plasma utuh		Enter

- a. All requested variables entered.
 b. Dependent Variable: asam lemak poli tak jenuh (DHA)

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.788 ^a	.621	.604	7.6345

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2098.909	1	2098.909	36.011	.000 ^a
	Residual	1282.283	22	58.286		
	Total	3381.192	23			

- a. Predictors: (Constant), integritas membran plasma utuh
 b. Dependent Variable: asam lemak poli tak jenuh (DHA)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-9.812	6.623		-1.481	.153
	integritas membran plasma utuh	.643	.107	.788	6.001	.000

- a. Dependent Variable: asam lemak poli tak jenuh (DHA)