

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

Dasrul¹, Hardjopranjoto², Mahaputra L³ dan Sudjarwo⁴

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa senyawa oksigen reaktif dan pengaruhnya terhadap integritas membran plasma spermatozoa kerbau lumpur hasil sentrifugasi gradien densitas percoll. Penelitian ini menggunakan semen segar kerbau lumpur sehat yang diperoleh dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan. Sampel semen dibagi dalam tiga kelompok yaitu tanpa sentrifugasi (kontrol) sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit dan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit. Selanjutnya semen hasil sentrifugasi diamati produksi senyawa oksigen reaktif dan integritas membran spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi ROS spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll meningkat secara bermakna ($p < 0,05$), sedangkan persentase membran plasma utuh menurun secara bermakna ($p < 0,05$). Tingkat produksi ROS dan penurunan persentase integritas membran plasma utuh spermatozoa kerbau lumpur setelah sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit. Tingkat produksi ROS berkorelasi negatif dengan persentase integritas membran plasma utuh spermatozoa. (*JKS 2007; 2:69-80*)

Kata Kunci: Sperma kerbau lumpur; sentrifugasi gradien densitas percoll, ROS, integritas membran plasma utuh

Abstract. The objective of this research was to find out the effect of preparation of sperm by using percoll gradient density centrifugation on the of reactive oxygen species (ROS) production and the damage integrity membranre of sperm swamp buffalo. 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. Subsequently a determination of ROS production and damage membrane integrity of sperm. The collected data in this research were analysed varians and regression analysis. The result showed that ROS production after preparation with percoll density gradient centrifugation was highest of significant ($p < 0,05$) and the procentage intact membrane of sperm a significant decreased ($p < 0,05$). The increase of ROS concentration and decrease of procentage plasma membrane intact were after percoll density gradient centrifugation for 10 minutes increase significantly ($p < 0,05$) compared with percoll density gradient centrifugation for 5 minutes. The ROS concentration of spermatozoa has correlated with the prosentage of membrane plasma intact of spermatozoa after percoll density gradient centrifugation. (*JKS 2007; 2:69-80*)

Keywords: Sperm of swamp buffalo; percoll gradien density centrifugation, ROS, integrity membrne plasma intact

Pendahuluan

Transfer embrio merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang meningkatkan mutu genetik ternak dalam waktu yang relatif cepat.¹¹

Namun dalam pelaksanaannya dilapangan banyak ditemukan kendala, diantaranya adalah terbatasnya embrio yang siap ditransferkan. Upaya untuk pengatasi keterbatasan embrio dengan tingkat perkembangan yang seragam, dewasa ini banyak dilakukan melalui pemanfaatan teknologi *in vitro* fertilisasi (IVF). *In vitro* fertilisasi merupakan teknik pembuahan yang terjadi di luar tubuh induk dengan cara mempertemukan sel telur yang telah matang dengan sel spermatozoa berkapasitasi dalam cawan yang berisi

Dasrul adalah tenaga pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Hardjopranjoto dan Mahaputra L adalah tenaga pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Sudjarwo adalah tenaga pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

medium kultur.² Khusus pada spermatozoa sebelum digunakan untuk fertilisasi *in vitro* terlebih dahulu harus mengalami pencucian, untuk memisahkan spermatozoa motil dengan immotil dan bahan-bahan toksik lainnya seperti leukosit, bakteri dan prostaglandin, serta kreoprotektan yang terdapat pada semen beku.³

Sentrifugasi gradien densitas percoll merupakan salah satu metode pencucian spermatozoa yang dilakukan dengan cara pemutaran semen dalam tabung yang berisi medium percoll dalam berbagai tingkat gradien pada waktu dan kecepatan tertentu.³ Telah banyak dibuktikan bahwa pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll menghasilkan persentase spermatozoa motil dengan morfologi baik yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa pencucian.⁴ Namun demikian spermatozoa hasil pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll juga menimbulkan efek negatif terhadap spermatozoa seperti terjadinya perubahan pola kapasitasi dan kerusakan membran plasma, sehingga daya tahan hidup spermatozoa menjadi rendah.^{5,6}

Kerusakan integritas membran plasma spermatozoa akibat pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll sudah pernah dilaporkan peneliti sebelumnya. Susilawati menemukan adanya kerusakan struktur dan fungsi membran spermatozoa sapi Bali setelah sentrifugasi gradien densitas percoll.⁵ Sedangkan hasil pemeriksaan mikroskop elektron pada spermatozoa kerbau lumpur setelah sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat adanya kerusakan integritas dan struktur membrane spermatozoa.^{7,8} Besarnya tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa setelah pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll sangat tergantung pada lama dan kecepatan sentrifugasi serta jenis spermatozoa yang digunakan. Namun bagaimana mekanisme kerusakan integritas dan struktur membran

spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll sampai saat ini belum terungkap sepenuhnya, sehingga menjadi kendala dalam pencegahannya. 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 disekitarnya.^{4,9} ROS terbukti dapat menyebabkan disfungsi sel melalui perubahan fungsi protein (enzim, reseptor, anti bodi, pembentukan matrik dan sitoskeleton), rantai DNA dan membran sel, sehingga integritas sel menjadi terganggu. ROS yang terlibat dalam berbagai proses biologi sel termasuk spermatozoa, sebagian besar berasal dari proses metabolisme alami oksigen untuk menghasilkan adenosin triphosphate (ATP), melalui proses fosforilasi oksidatif di mitokondria. Dalam kondisi normal sekitar 1 – 3 % dari oksigen direduksi secara univalen menjadi ROS di mitokondria.^{4,10} ROS dalam konsentrasi rendah berperan sebagai mediator fungsi spermatozoa dan terlibat dalam hiperaktivasi, kapasitasi, reaksi akrosom dan fusi spermatozoa dengan sel telur, namun dalam konsentrasi tinggi akan menyebabkan peroksidasi lipid, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, kerusakan integritas membran dan pemutusan rantai DNA yang selanjutnya menyebabkan hilangnya motilitas spermatozoa.^{10,11} Hal ini terjadi pada suatu keadaan yang disebut stress oksidatif, dimana produksi ROS sangat meningkat melebihi kemampuan enzim antioksidan untuk menetralsirnya.^{9,10} Dalam keadaan trauma fisik yang berat pada sel, produksi ROS dapat meningkat, karena ambilan oksigen dan kegiatan metabolisme makin meningkat.⁹ Produksi ROS spermatozoa manusia yang mengalami truma fisik akibat pembilasan secara sentrifugasi meningkat beberapa kali diatas normal.^{12,13} Besarnya tingkat produksi ROS setelah pembilasan dengan sentrifugasi sangat

tergantung pada lama dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan. Oleh karena itu kajian tentang penetapan lama waktu sentrifugasi gradien densitas percoll dengan mempertimbangkan tingkat kerusakan integritas membran spermatozoa pada individu tertentu merupakan suatu hal yang penting. Lama waktu sentrifugasi harus ditetapkan secara tepat pada tiap individu berdasarkan prinsip dasar pencucian, agar tujuan pencucian dapat tercapai tanpa menyebabkan penurunan kualitas fungsional spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lamanya waktu sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap produksi ROS spermatozoa dan pengaruhnya terhadap integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa kerbau lumpur. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang pengaruh lamanya waktu sentrifugasi pada proses pencucian terhadap kerusakan membran plasma yang diikuti dengan menurunnya kualitas fungsional spermatozoa pada penerapan teknik *in vitro* fertilisasi (IVF).

Materi Dan Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Kebidanan dan *In vitro* FKH Unair dan laboratorium Makmal RSUD Dr. Soetoma Surabaya sejak bulan Februari sampai April 2004.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah kandang, seperangkat Vagina buatan, Berthold luminometer (Automatic LB 953; Wallac Inc. Gaithersburg, MD, USA), Vortex mixer (Thermolyne USA), mikroskop biokuler (Olympus), Mikroskop fase Kontras (Meiji, Japan), centrifuge (EBA-3S, Hettich), Laminar Air Flow (Speg Air Tech, PRC), Incubator CO₂ (Compact CO₂, series

5000, USA), gunting, termos es, water bath, mikropipet, pemanas bunsen, backer glass, objec glass, stopwach, labu erlenmeyer, tabung reaksi, tabung centrifuge, kertas tissue, haemocytometer, Refreegerator (Shap, Japan), camera digital (Canon), kertas saring.

Bahan yang di gunakan adalah semen segar kerbau lumpur, medium percoll isotonis, medium earle's balance salt solution (Sigma USA), bovine serum albumin (BSA), media luminol (Sigma USA), Horseradish peroxidase (Sigma USA), DMSO (Mereck), Na Cl fisiologis, alkohol, minyak emersi, eosin-nigrosin, aquadest, kuning telur, gliserol, larutan hypoosmotik 0,032 M (dibuat dari 7,35gr Na Citrat 2H₂O, 13,52gr fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades),

Pembuatan medium gradien densitas percoll

Gradien densitas percoll yang digunakan pada penelitian ini terdiri 90 %; 75 %; 60 %; 45 % dan 30 % (5 tingkat). Kemudian larutan dari berbagai densitas tersebut disusun dalam tabung ukuran 15 ml secara berurutan dari densitas yang tertinggi sampai terendah masing-masing 1,0 ml volume total masing-masing adalah 5 ml.

Penampungan Semen

Sampel semen yang akan digunakan diambil dari Kerbau lumpur jantan, sehat berumur 3 – 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.

Segara setelah penampungan semen, dilakukan pemeriksaan kualitas secara makroskopis dan mikroskopis. Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa > 600 x 10⁶/ml dan motilitas progresif > 70 % , abnormalitas < 20 % digunakan sebagai sampel. Segara setelah penilaian, sampel semen yang layak selanjutnya

diencerkan dengan medium EBSS dengan perbandingan 1 : 2 dan masukan dalam tabung untuk perlakuan selanjutnya. Kemudian suspensi semen tersebut dibagi menjadi tiga bagian dan masukan dalam tabung centrifuge sesuai dengan kelompok perlakuan yaitu sampel semen yang disentrifugasi gradien densitas percoll (P0); sampel semen yang disentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit (P1) dan 20 menit (P2).

Pencucian Spermatozoa dengan sentrifugasi Gradien densitas Percoll

Sebanyak 1 ml suspensi semen dimasukkan dalam tabung yang sudah diisi medium percoll dalam beberapa tingkat gradien (90 %; 75 %; 60 %; 45 % dan 30 %), selanjutnya sentrifugasi pada kecepatan 2250 rpm selama 10 menit dan 20 menit (sesuai perlakuan) pada temperatur kamar. Setelah sentrifugasi bagian paling atas dibuang dan tinggalkan 1/3 bagian bawah. Selanjutnya masukan dalam tabung reaksi steril lainnya untuk digunakan sebagai sampel penelitian ini. Masing-masing tabung tersebut diresuspensi dengan 3 ml medium EBSS dan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit untuk proses pencucian. Selanjutnya buang supernatannya dan pellet yang tertinggal diresuspensi lagi dengan 3 ml medium EBSS lalu biarkan selama 10 menit. Sedangkan untuk kontrol semen tidak disentrifugasi gradien densitas percoll tetapi hanya di swim up saja. Selanjutnya ke 3 sampel semen di inkubasikan selama 15 menit inkubator CO₂ pada suhu 37 °C dengan kelembaban 95 %, dan amati produksi ROS dan kualitas fungsional spermatozoanya.

Pemeriksaan Produksi ROS Spermatozoa

Pemeriksaan kadar ROS spermatozoa dilakukan dengan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Aitken et al. 1991 dan Iwazaki and Gagnon (1992). Sebanyak 400 ul suspensi spermatozoa

dari masing-masing kelompok ditambahkan 4 ul larutan luminol (25 mM luminol dalam dimethylsulphoxide dengan konsentrasi akhir 250 uM) dan 8 ul larutan horseradiish peroksidase (2mg/ml dalam larutan buffer sulfat), selanjutnya divortek selama 30 detik. Kemudian appendorf yang berisi dimasukan dalam tabung khusus dan amati khemiluminisensinya selama satu menit dengan menggunakan Berthold luminolmeter (Autolumat LB 953: Wallac Inc, Gaithersburg, MD. USA). Nilai ROS dihitung per menit (CPM) per 10⁶ spermatozoa

Pemeriksaan membran plasma utuh (MPU):

Pemeriksaan membran plasma utuh sperma dilakukan berdasarkan uji pembengkakan atau *hyposmotik swelling test* (HOS-Test) sebagaimana yang dikembangkan oleh Jayendra, et al. (1984) dan Rasul et al. (2001). Sebanyak 0,1 ml suspensi sperma hasil pencucian ditambahkan ke dalam 0,9 ml larutan hyposmotik 0,032 m (yang dibuat dari 7,35gr Na Citrat 2H₂O, 13,52 gr fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquadest) dan diinkubasikan selama 1 jam di dalam inkubator pada suhu 37° C, selanjutnya dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan 1 tetes larutan di atas dengan 1 tetes eosin nigrosin, diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400X. Spermatozoa dihitung dengan cara berurutan atau zig zag sampai 10 lapang pandang atau jumlah spermatozoa 100 – 200. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma yang utuh ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti dengan ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedangkan spermatozoa yang membran plasmanya sudah rusak ditandai dengan tidak ada pembengkakan kepala dan ekor yang lurus.

*Dasrul dkk, Peran Senyawa Oksigen Reaktif dalam Mekanisme
Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur
Setelah Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll*

$$\text{Persentase MPU} = \frac{\text{Jumlah MPU}}{\text{Jumlah total spermatozoa yang dihitung} \times 100\%}$$

Analisa Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan 3 kelompok perlakuan lama waktu sentrifugasi (tanpa sentrifugasi; sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit dan 20 menit). Masing-masing kelompok perlakuan diulangi sebanyak 5 kali. Data yang persentase produksi ROS dan persentase integritas MPU spermatozoa diperoleh pada penelitian ini di analisis dengan menggunakan analisa varian (ANAVA) satu arah, dan bila ada perbedaan antara perlakuan maka data selanjutnya diuji dengan uji beda nyata terkecil (BNT) ¹⁴.

Hasil Dan Pembahasan

Produksi ROS spermatozoa

Rerata produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur pada kelompok kontrol dan setelah pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terlihat pada tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Rerata (SD) produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur setelah pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll

Perlakuan	Produksi ROS (CPM/ml/10 ⁶ sperma)
P0	6,34 ± 1,75 ^a
P1	14,41 ± 5,61 ^{bc}
P2	18,98 ± 11,11 ^c

Ket: Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna (p<0,05)

Dari tabel 1 diatas menunjukkan bahwa produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur mengalami peningkatan setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll dibandingkan tanpa sentrifugasi (kontrol). Peningkatan produksi ROS oleh spermatozoa seiring dengan lama waktu sentrifugasi yang dilakukan.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa produksi ROS spermatozoa berbeda secara bermakna (p<0,05) antara kontrol dengan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll. Konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa setelah pencucian dengan setrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih tinggi secara bermakna (p<0,05) dibandingkan dengan kontrol, akan tetapi lebih rendah secara tidak bermakna (p>0,05) dibandingkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit. Sedangkan konsentrasi ROS spermatozoa pada kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih tinggi secara sangat bermakna (p<0,01) dibandingkan dengan kontrol. Hasil penelitian ini sejalan dengan yang dilaporkan Iwazaki dan Gagnon yang menemukan peningkatan produksi ROS spermatozoa manusia setelah pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll sebanyak 4 – 5 kali di atas konsentrasi ROS spermatozoa basal (dari 8 mV/s/10⁹ spz menjadi 71 mV/s/10⁹ spz).¹²

Meningkatnya konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa setelah pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll kemungkinan diakibatkan oleh adanya trauma mekanik pada membran spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Aitken et al (1998) 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 influk ion Ca^{2+} dalam sel. Tingginya konsentrasi ion Ca^{2+} intraselluler akan meningkatkan pengikatannya dengan kalmodulin membentuk ikatan Ca^{2+} -kalmodulin yang penting untuk mengaktifkan enzim calpain untuk merubah xanthin dehidrogenase menjadi xanthin oksidase. Selanjutnya xanthin oksidase akan mengoksidasi xanthin dan hipoxanthin membentuk radikal superoksida anion (O_2^-). Kemudian radikal superoksida anion ini melalui reaksi Fenton dan Haber Weiss berubah menjadi peroksidase (H_2O_2) dan radikal hidroksil ($\text{OH}^\cdot$).

Meningkatnya konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll juga dapat diakibatkan oleh terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa. Plasma seminalis selain penting sebagai nutrisi dan media transport spermatozoa juga banyak mengandung enzim-enzim yang bersifat sebagai antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), catalase dan glutathion peroksidase yang penting sebagai scavenger ROS. Terpisah atau hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa mengakibatkan menipisnya kandungan enzim-enzim antioksidan dalam suspensi, sehingga ROS yang dihasilkan dari metabolisme spermatozoa tidak mampu dinetralisir dan menyebabkan kadarnya dalam suspensi menjadi meningkat tajam. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Iwazaki dan Gagnon, bahwa konsentrasi ROS spermatozoa manusia setelah pemisahan plasma seminalis meningkat 20 – 50 kali dari kadar basal ($8 \text{ mV/s}/10^9 \text{ spz}$ menjadi $406 \text{ mV/s}/10^9 \text{ spz}$). Akan tetapi penambahan kembali plasma seminalis pada pellet spermatozoa dapat menurunkan konsentrasi ROS sebanyak 70 – 80 % (dari $406 \text{ mV/s}/10^9 \text{ spz}$ menjadi $61 \text{ mV/s}/10^9 \text{ spz}$).¹²

Meskipun peningkatan konsentrasi ROS spermatozoa setelah sentrifugasi selama 5 menit tidak berbeda secara bermakna ($p>0,05$) dengan sentrifugasi selama 10 menit, namun ada suatu kecenderungan bahwa semakin lama waktu sentrifugasi akan semakin tinggi konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Shakarriz et al. yang menemukan konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa manusia setelah sentrifugasi selama 10 menit lebih tinggi secara sangat bermakna ($p<0,01$) dibandingkan dengan setelah sentrifugasi selama 2 menit ($96 \text{ mV/s}/10^6 \text{ spz}$ menjadi $18,36 \text{ mV/s}/10^6 \text{ spz}$).¹³ Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinueus dapat memicu peningkatan produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur. Namun lama waktu sentrifugasi berpengaruh secara nyata terhadap akumulasi produksi ROS spermatozoa kerbau lumpur.

Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa

Hasil pengamatan integritas membran plasma utuh (MPU) dengan menggunakan metode *hypoosmotik swelling test* dan pewarnaan eosin negrosin yang diamati dengan mikroskop cahaya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar1. Integritas membran plasma spermatozoa kerbau lumpur yang diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X; a) spermatozoa dengan membran plasma utuh b) spermatozoa dengan membran plasma rusak

Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma utuh dan hidup ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti ekor berputar dengan pancaran warna terang (a). Spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak dan hidup ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna terang (b). Sedangkan spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak dan mati ditandai dengan

ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna merah.

Rata-rata persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa Sapi Brahman yang diamati dengan metode HOS-test pada kelompok kontrol dan perlakuan sentrifugasi terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata ($\pm$ SD) persentase Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Sapi Brahman Kontrol dan Perlakuan Sentrifugasi

Perlakuan	ulangan	Rata-rata MPU (%)
Kontrol	5	79,50 $\pm$ 3,21 ^a
Sentrifugasi 5 menit	5	53,25 $\pm$ 5,15 ^{bc}
Sentrifugasi 10 menit	5	47,50 $\pm$ 4,84 ^c

Ket: Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

Dari tabel 2 diatas terlihat bahwa persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa mengalami penurunan setelah perlakuan pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dibandingkan kontrol. Penurunan persentase MPU spermatozoa seiring dengan lama waktu sentrifugasi. Hasil analisis statistik terhadap persentase MPU spermatozoa menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll. Persentase MPU spermatozoa kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 5 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok kontrol dan lebih tinggi secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit. Sedangkan persentase MPU spermatozoa pada kelompok sentrifugasi gradien densitas percoll selama 10 menit lebih rendah secara sangat bermakna ($p > 0,01$) di bandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan pencucian spermatozoa kerbau lumpur dengan sentrifugasi gradien

densitas percoll dapat menginduksi terjadinya kerusakan integritas membran plasma spermatozoa. Hasil penelitian ini sejalan dengan pernyataan yang diungkapkan oleh Susilawati dan Dasrul dkk., bahwa proses pencucian spermatozoa dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menyebabkan kerusakan pada membran spermatozoa. Kondisi ini terjadi sebagai akibat adanya benturan dan gesekan antara spermatozoa dengan dinding tabung atau dengan spermatozoa yang lain selama proses sentrifugasi.^{5,7}

Menurunnya persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah pencucian dengan sentrifugasi kemungkinan disebabkan oleh faktor kimiawi dan faktor fisik. 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 spermatozoa seperti fosfolipid dan kolesterol.¹⁵ Kolesterol 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. Selain itu serum albumin yang terkandung pada medium pencucian mempunyai peranan penting dalam proses penghilangan kolesterol dan ion zinkum yang berfungsi menstabilkan membran plasma spermatozoa. Hal ini disebabkan karena protein tersebut mempunyai kemampuan yang kuat untuk mengikat kolesterol dan ion zinkum. 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 semakin sedikit kadar kolesterol membran akan menyebabkan

membran spermatozoa semakin cepat mengalami kerusakan.^{16,17}

Adanya penurunan persentase MPU spermatozoa setelah pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll kemungkinan lain juga dapat dipicu oleh terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa. 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 dalam menjaga integritas fungsional membran plasma spermatozoa, protein berperan dalam melindungi membran plasma tetap lentur dan merupakan jaket bagi spermatozoa dari kerusakan irreversibel, sedangkan asam askorbat berperan sebagai zat antioksidan yang penting untuk melindungi spermatozoa dari serangan senyawa oksigen reaktif.² Dengan demikian hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa selama proses sentrifugasi akan mengakibatkan perlindungan spermatozoa dari bahan-bahan perusak seperti serangan senyawa oksigen reaktif akan menjadi berkurang, sehingga menyebabkan spermatozoa akan mudah rusak.

Hasil penelitian ini, juga menunjukkan bahwa penurunan persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah pencucian dengan sentrifugasi gradien densitas percoll seiring dengan peningkatan lama waktu sentrifugasi yang digunakan. Persentase MPU spermatozoa yang ditemukan pada kelompok perlakuan sentrifugasi selama 10 menit lebih rendah secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan sentrifugasi selama 5 menit maupun 5 menit. Kondisi ini berkaitan dengan lama dan besarnya gesekan mekanik pada permukaan membran spermatozoa. Makin lama gesekan mekanik yang terjadi maka makin besar

pula kerusakan integritas membran plasma yang terjadi pada spermatozoa. Makin tinggi tingkat kerusakan membran spermatozoa akan menyebabkan persentase MPU spermatozoa makin menurun yang selanjutnya motilitas spermatozoa menjadi menurun.¹³

Hubungan konsentrasi ROS dengan persentase membran Plasma Utuh Spermatozoa

Hasil analisis korelasi memperlihatkan bahwa produksi ROS berhubungan secara negatif dengan persentase membran plasma utuh spermatozoa kerbau lumpur dengan nilai kemaknaan ($p < 0,01$), nilai koefisien korelasi (r) = - 0,655 dan nilai koefisien determinasi (r^2) = 0,429. Hasil ini menunjukkan bahwa makin tinggi produksi ROS menyebabkan persentase membran plasma utuh spermatozoa semakin menurun. Kondisi ini membuktikan bahwa peningkatan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa berpengaruh secara sangat nyata terhadap penurunan persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur. Tingginya penurunan persentase MPU spermatozoa diakibatkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid oleh ROS. Pada membran sel spermatozoa ROS (OH^-) dapat bereaksi komponen asam lemak poli tak jenuh, khususnya decoxahexanoic acid (DHA) dan arakidonat membentuk reaksi rantai yang menyebabkan terputusnya ikatan asam lemak yang penting untuk mempertahankan permeabilitas sel spermatozoa. Semakin tinggi konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa akan menyebabkan semakin banyak pemutusan ikatan asam lemak poli tak jenuh dan selanjutnya akan semakin tinggi tingkat kerusakan pada membran plasma. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan Dasrul ditemukan adanya penurunan kadar DHA membran spermatozoa dan peningkatan kadar malondialdehyde (MDA) dalam suspensi spermatozoa kerbau lumpur.

Terdapat korelasi sangat bermakna antara peningkatan kadar MDA dengan penurunan kadar DHA dan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa kerbau lumpur.⁸

Dari hasil penelitian ini dapat dibuktikan bahwa peningkatan akumulasi produksi ROS dalam suspensi spermatozoa dapat menyebabkan penurunan persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur melalui reaksi peroksidasi lipid pada membran spermatozoa. Makin tinggi reaksi peroksidasi lipid yang terjadi makin tinggi tingkat kerusakan membran plasma spermatozoa. Selanjutnya akan makin tinggi tingkat penurunan MPU spermatozoa.

Kesimpulan

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

1. Pencucian spermatozoa kerbau lumpur dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinueus berpengaruh terhadap konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa. Tingkat konsentrasi ROS spermatozoa kerbau lumpur setelah sentrifugasi selama 10 menit lebih tinggi secara tidak bermakna ($p > 0,05$) dibandingkan dengan sentrifugasi selama 5 menit.
2. Pencucian spermatozoa kerbau lumpur dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinueus berpengaruh terhadap persentase integritas membran plasma utuh spermatozoa. Tingkat persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur setelah sentrifugasi selama 10 menit lebih rendah secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan sentrifugasi selama 5 menit.
3. Konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa berkorelasi negatif dengan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa kerbau lumpur. Makin tinggi konsentrasi ROS dalam suspensi spermatozoa, makin rendah persentase integritas membran

plasma utuh (MPU) spermatozoa kerbau lumpur.

Daftar Pustaka

1. Sudrajat, D. S., R. Pambudy. Peduli Peternakan Rakyat. Menjelang Dua Abad Sejarah Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia, Jakarta: Penerbit Yayasan Agrindo Mandiri. 2003.
2. Hafez, E.S.E. Spermatozoa and seminal plasma dalam Reproduction in Farm Animal, 7th ed. Lea & Febiger Philadelphia, USA 2004: 166 – 188
3. Hughes C.M., S.E., Lewis, Mc Kelvey – V.J.Martin. and W.Thompson. The effects of antioxidant supplementation during percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.* 1998: May. 13 (5) : 1240 – 7
4. Aitken R. J. and H.M. Fishert, Reactive oxygen species generation and human spermatozoa; the balance of benefit and risk *BioEssay*; 1994: 16; 259 – 267
5. Susilawati, Analisis memberan spermatozoa sapi hasil filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll pada proses seleksi jenis kelamin. Disertasi Pascasarjana Unair Surabaya. 2000.
6. Dasrul, M. Adam, A. Damhoeri dan Sunarti, Uji kualitas, Integritas membran spermatozoa kerbau lumpur hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien percoll. Laporan penelitian PHB VI tahun pertama. Universitas Syiah Kuala Banda Aceh. 1999.
7. Dasrul. Pengaruh berbagai macam tehnik pemisahan terhadap integritas membrane spermatozoa kerbau lumpur, Prosseding seminar Bioteknologi Reproduksi Brawijaya University Malang. 2002.
8. Dasrul,. Peran Senyawa Oksigen Reaktiv Dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau lumpur Hasil Sentrifugasi . Disertasi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya. 2005
9. Halliwell, B and J.M.C.Gutteridge,. Free radicals in Biology and Medicine. Third edition, Oxford : Oxford University Press, 1999: 1 – 35, 246 – 350; 664 – 667
10. Agarwal, A., R. A. Saleh and M.A. Bedaiwy. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 2003: 79: 829 – 843
11. Agarwal, A., I. Ikemoto and K.R. Loughlin,. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim up and L4 filtration methods. *Arch Androl* 2004: 32: 169 - 174.
12. Iwasaki A and C.Gagnon. Formation of reactive oxygen spesies in spermatozoa of

*Dasrul dkk, Peran Senyawa Oksigen Reaktif dalam Mekanisme
Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur
Setelah Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll*

- infertile patient. *Fertil. Steril.* 1992: 57; 408 – 416
13. Shekarriz M., A.J. Thomas and A. Agarwal. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol* 1995: 28: 31 – 35.
 14. Steel, R.G.D and Torrie j.. Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biometrik. Alih bahasa Bambang Sumantri, Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama. 1991
 15. Guzman, E.G., M. Ollero, M.C. Lopez, R.K. Sharma, J.G. Alvarez, A.J. Thomas and A. Agarwal. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod.* 2001: 16.9. : 1922 – 1930
 16. Cross, N.L. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation, *Journal Biologi of Reproduction*, 1998: 59: 7-11
 17. Visconti P. E., H.G. Homer, X. P. Ning, G.D. Moore, J.P. Valenzuela, C. J. Jorgez, J.G. Alvarez and G.S. Kopf. Cholesterol Efflux-mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm, *The Journal of Biological Chemistry* 1999: 274. 5. :3235 – 3242