

**KADAR MDA SPERMATOZOA DAN SEMINAL  
PLASMA SETELAH PEMBEKUAN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**Khairatul Insani Febrianti  
105090100111031**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

**KADAR MDA SPERMATOZOA DAN SEMINAL PLASMA  
SETELAH PEMBEKUAN**

**SKRIPSI**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

Oleh :

**Khairatul Insani Febrianti  
105090100111031**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**KADAR MDA SPERMATOZOA DAN SEMINAL PLASMA  
SETELAH PEMBEKUAN**

Oleh :

**Khairatul Insani Febrianti**  
**105090100111031**

**Telah dipertahankan di depan majelis penguji  
Pada tanggal 7 Juli 2014  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

**Mengetahui,  
Pembimbing I**

**Dr. Sri Rahayu, M. Kes**  
**NIP. 19620528 198701 2 001**

**Mengetahui,  
Ketua Program Studi S-1 Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Rodliyati Azrianingsih, S.Si., MAg. Sc., Ph.D**  
**NIP. 19700128 199412 2 001**

## HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Khairatul Insani Febrianti  
Nim : 105090100111031  
Jurusan : Biologi  
Judul skripsi : Kadar MDA Spermatozoa dan Seminal Plasma Sapi Setelah Proses Pembekuan

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Tugas Akhir ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain, karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila dikemudian hari diketahui isi skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 7 Juli 2014  
Yang menyatakan

Khairatul Insani Febrianti  
NIM. 105090100111031

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA





# KADAR MDA SPERMATOZOA DAN SEMINAL PLASMA SETELAH PEMBEKUAN

Khairatul Insani, Sri Rahayu.

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya, Malang.  
2014

## Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek lama pembekuan semen terhadap kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma dan persentase viabilitas spermatozoa. Sampel yang digunakan berupa semen beku sapi Limousin dengan lama pembekuan 2 bulan dan 3 bulan yang dikoleksi dari BBIB Singosari. Semen beku yang telah di *thawing* diencerkan dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) kemudian disentrifugasi untuk memisahkan spermatozoa dan seminal plasma. Kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan pewarnaan eosin-negrosin. Data dianalisis dengan uji-t berpasangan dan korelasi pearson menggunakan spss 16.0. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar MDA spermatozoa pada lama pembekuan 2 bulan ( $0,0777 \pm 0,008$  nM) dan 3 bulan ( $0,0919 \pm 0,016$  nM) tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Kadar MDA seminal plasma pembekuan 2 bulan ( $0,1168 \pm 0,018$  nM) dibandingkan pembekuan 3 bulan ( $0,1172 \pm 0,026$  nM) tidak berbeda nyata. Terdapat korelasi negatif antara persentase viabilitas dan kadar MDA baik pada spermatozoa dan seminal plasma.

**Kata kunci:** MDA, semen beku, seminal plasma

# THE MDA LEVELS OF SPERMATOZOA AND SEMINAL PLASMA AFTER LONG-TERM FREEZING

Khairatul Insani, Sri Rahayu

Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,  
University of Brawijaya, Malang

2014

## Abstract

The aim of this research was to determine the effect of long-term freezing on spermatozoa and seminal plasma MDA levels, and spermatozoa viability. Frozen semen of cattle limousine that had been stored for 2 and 3 months were collected from BBIB Singosari used in this study. The frozen-thawed semen was diluted with Phosphate Buffer Saline (PBS) and then centrifuged to separate the spermatozoa and seminal plasma. The MDA levels of spermatozoa and seminal plasma were measured by spectrophotometer. Spermatozoa viability was assessed using Eosin-Negrosin staining. The data were analyzed using paired t-test and Pearson correlation employing SPSS 16.0 for Windows. The result showed that MDA levels of spermatozoa for 2 months storage ( $0.0777 \pm 0.008$  nM) and 3 months storage ( $0.0919 \pm 0.016$  nM) were not significant differences ( $p < 0.05$ ). Seminal plasma MDA levels were not significant differences between 2 months storage ( $0.1168 \pm 0.018$  nM) and 3 months storage ( $0.1172 \pm 0.026$  nM). There is negative correlation between the percentage of viability and both spermatozoa and seminal plasma of MDA levels

**Keywords:** MDA, semen frozen, seminal plasma



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, berkah, kasih dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “Kadar MDA Spermatozoa dan Seminal Plasma Setelah Pembekuan”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang membantu dan berperan dalam proses penyelesaian skripsi ini. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
2. Dr. Sri Rahayu, M.Kes sebagai dosen pembimbing I dan ketua Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler atas bimbingan yang telah diberikan untuk menyelesaikan skripsi ini.
3. Dr. Agung Pramana W.M, M.Si sebagai dosen penguji I dan Drs. Aris Soewondo M.Si sebagai dosen penguji II atas kritik dan saran yang telah diberikan untuk menyelesaikan skripsi ini.
4. Ayahanda Abdul Qodir, ibunda Siti Sholikah, saudaraku Ahmad Sonhaji dan Muhammad Muflih Nurhadi.
5. Tim Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, khususnya Susiati, M.Biomed.
6. Teman-teman biologi, Lutfiatun Izzatul L., S.Si., Winda Rahayu S.Si., Sholifatul Liliana A., S.Si., mbak Afifi Inayah, S.Si. dan Nurizza Fauziyah.
7. Ahmad Bayhaqi, S.Kel., Laily Dwi I., S.Pd., dan Ali Al Harkan yang selalu memberikan motivasi.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah mendukung penyelesaian penulisan skripsi ini.

Penulisan skripsi ini merupakan suatu usaha penulis sebagai sarana dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan masih jauh dari sempurna. Saran dan kritik sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini bermanfaat

Malang, 7 Juli 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
1.5 Hipotesis Penelitian.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Semen .....	5
2.1.1 Seminal Plasma .....	5
2.1.2 Spermatozoa .....	6
2.2 Fisiologi Spermatozoa .....	8
2.3 Pengawetan Spermatozoa .....	9
2.4 Radikal Bebas .....	10
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>13</b>
3.1 Waktu dan Tempat.....	13
3.2 Cara Kerja.....	13
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>15</b>
4.1 Kadar MDA Spermatozoa dan Seminal Plasma .....	15
4.2 Hubungan Antara Viabilitas dan Kadar MDA .....	17
<b>BAB V PENUTUP</b> .....	<b>21</b>
5.1 Kesimpulan .....	21
5.2 Saran .....	21

DAFTAR PUSTAKA .....	23
LAMPIRAN .....	29

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
2.1	Anatomi Spermatozoa .....7
4.1	Kadar MDA Seminal Plasma dan Spermatozoa Semen Beku dengan Lama Pembekuan 2 Bulan dan 3 Bulan.....16
4.2	Spermatozoa Dengan Pewarnaan Eosin-Negrosin .....17



## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
4.1	Kadar MDA Spermatozoa dan Seminal Plasma.....15
4.2	Hubungan antara Viabilitas dan Kadar MDA .....18

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## DAFTAR LAMPIRAN

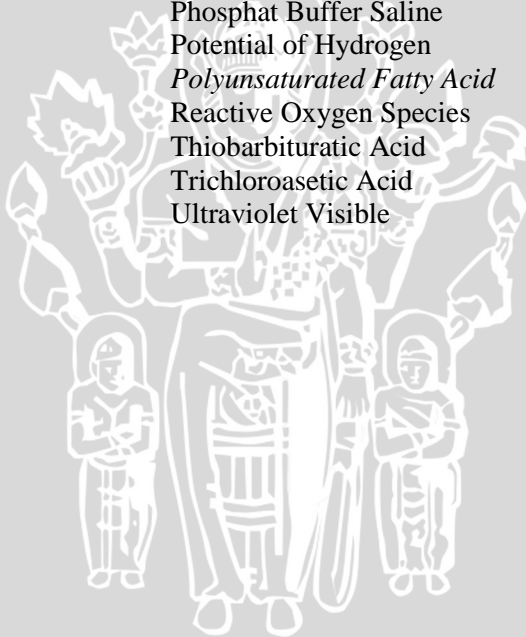
	<b>Halaman</b>
<b>Lampiran 1</b>	Analisis Statistika Kurva Standar .....29
<b>Lampiran 2</b>	Grafik Kurva Standar .....30
<b>Lampiran 3</b>	Uji Normalitas Data MDA Spermatozoa .....31
<b>Lampiran 4</b>	Hasil Uji T Berpasangan MDA Spermatozoa .....32
<b>Lampiran 5</b>	Uji Normalitas Data MDA Seminal Plasma .....33
<b>Lampiran 6</b>	Hasil Uji T Berpasangan MDA Seminal Plasma .....34
<b>Lampiran 7</b>	Uji Normalitas Data Viabilitas Semen Beku 2 Bulan dan 3 Bulan .....35
<b>Lampiran 8</b>	Hasil Uji T Berpasangan Viabilitas Semen Beku 2 Bulan dan 3 Bulan .....36
<b>Lampiran 9</b>	Hasil Uji Korelasi Viabilitas Semen Beku dan Kadar MDA Spermatozoa .....37
<b>Lampiran 10</b>	Hasil Uji Korelasi Viabilitas Semen Beku dan Kadar MDA Seminal Plasma.....38





## DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
ADP	Adenosin Di Phosfat
ATP	Adenosin Tri Phosfat
BBIB	Balai Besar Inseminasi Buatan
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
IB	Inseminasi Buatan
MDA	malondialdehid
mg	miligram
mL	mililiter
nm	namometer
PBS	Phospat Buffer Saline
pH	Potential of Hydrogen
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
ROS	Reactive Oxygen Species
TBA	Thiobarbituratic Acid
TCA	Trichloroasetic Acid
Uv-Vis	Ultraviolet Visible



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Berbagai metode bioteknologi reproduksi telah digunakan dalam meningkatkan kuantitas hewan ternak, salah satunya adalah inseminasi buatan (ISAA, 2013). Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu usaha penerapan teknologi tepat guna dan menjadi pilihan utama untuk meningkatkan populasi serta mutu genetik ternak. Guna peningkatan populasi tersebut maka dapat dilakukan dengan memanfaatkan teknologi reproduksi peternakan melalui teknik IB dengan menggunakan semen beku (Saidet *et al.*, 2005).

Semen beku merupakan semen yang diencerkan sesuai dengan prosedur tertentu untuk kemudian dibekukan jauh di bawah titik beku air (Hertoni *et al.*, 2007). Semen beku memiliki kelebihan diantaranya dapat disimpan dalam waktu tidak terbatas, dapat dikoleksi setiap saat dan dapat digunakan sewaktu dibutuhkan (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Namun dapat mengakibatkan menurunnya viabilitas, fungsi mitokondria dan motilitas sperma (O'Connell *et al.*, 2002).

Toelihere (1993) menyebutkan pembekuan merupakan suatu aktivitas pengeringan fisik yang menyebabkan terbentuknya kristal-kristal es dan penumpukan elektrolit serta bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel. Kristal sel intraseluler dapat merusak sperma secara mekanik. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein membran sel sperma dan pada waktu *thawing*, permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel. Spermatozoa manusia akan mengalami penurunan motilitas (O'Connell *et al.*, 2002) dan viabilitas dari 80% sebelum dibekukan menjadi 50% setelah pembekuan (Boitrelleet *al.* 2012). Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa penurunan motilitas sperma beku setelah *thawing* berhubungan dengan destabilisasi membran yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas terhadap ion-ion (Hafez, 2004) dan produksi ROS (Awdaet *al.*, 2009). Produksi ROS pada sperma adalah sebagai hasil proses fisiologi normal untuk reaksi akrosom dan kapasitas sperma (Herreroet *al.*, 1999). Namun produksi ROS berlebih pada sperma akan menjadi bahaya diakibatkan oleh efek merugikan pada jumlah sperma fungsional (Rath *et al.*, 2009).

Membran spermatozoa mamalia rentan teroksidasi oleh keberadaan ROS dikarenakan kaya akan asam lemak tak jenuh (Aitken *et al.*, 1996). Reaksi rantai peroksidasi lipid ini berlangsung terus menerus

(autokatalitik) hingga akhirnya merusak seluruh membran plasma sel spermatozoa (Holt, 2000). Cummins *et al.* (1994) menyatakan bahwa peroksidasi lipid dapat menyebabkan terjadinya perubahan fungsi membran yang berakibat terhadap penurunan metabolisme sperma, morfologi sperma, motilitas sperma dan fertilitas.

Malondiladehid (MDA) adalah suatu senyawa aldehid hasil dari peroksidasi lipid yang bersifat toksik terhadap sel. Senyawa MDA menyebabkan kerusakan membran spermatozoa dan penurunan integritas membran spermatozoa sehingga terjadi penurunan kualitas sperma (Sanocka *et al.*, 2004). Tidak terdapat perbedaan signifikan pada kadar MDA spermatozoa selama kriopreservasi kurang dari 13 bulan. Setelah 26 bulan penyimpanan, kadar MDA meningkat secara signifikan, dan pada kadar tertinggi ( $3.22 \pm 0.05$  nmol/mgprot) diketahui pada lama penyimpanan 73 bulan (Chen *et al.*, 2010).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas permasalahan yang dapat diambil pada penelitian ini adalah

1. Bagaimanakah efek lama pembekuan semen terhadap kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma sapi?
2. Bagaimanakah hubungan antara viabilitas dan kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma sapi?

## 1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk

1. Mengetahui efek lama pembekuan semen terhadap kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma sapi
2. Mengetahui hubungan antara viabilitas dan kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma sapi

## 1.4 Manfaat

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi kadar MDA semen beku dengan lama pembekuan berbeda sehingga dapat digunakan sebagai dasar pengembangan teknologi pembekuan spermatozoa.

## 1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0= Lama pembekuan spermatozoa tidak meningkatkan kadar MDA

H1= Lama pembekuan spermatozoa meningkatkan kadar MDA

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Semen

Semen adalah sekresi dari organ kelamin jantan yang terdiri atas seminal plasma dan spermatozoa (Togun dan Egbunike, 2006) dan diejakulasikan secara normal pada waktu kopulasi pada saluran kelamin betina (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang dihasilkan berasal dari testis. Presentase seminal plasma kurang lebih sebesar 90% dan spermatozoa sebesar 10%. Spermatozoa dihasilkan di dalam testis sedangkan seminal plasma dibuat oleh epididimis, kelenjar-kelenjar vesikulares dan prostat (Toelihere, 1985).

Volume semen yang dihasilkan tiap hewan berbeda-beda. Semen sapi dan domba mempunyai volume yang sedikit dengan konsentrasi sperma yang tinggi sehingga memberi warna krem, semen kuda dan babi mempunyai volume yang lebih banyak dengan konsentrasi spermatozoa yang lebih rendah sehingga semennya berupa cairan yang berwarna putih (Toelihere, 1985). Menurut Garner dan Hafez (2000), volume ejakulat semen domba atau kambing berkisar antara 0,8-1,2ml, konsentrasi 20-30 juta/ml, motilitas 60-80%, spermatozoa normal 80-95%, volume semen sapi bervariasi antara 5-8 ml tiap ejakulasi dan pH 5,9-7,3. Semen dengan pH lebih rendah maupun lebih tinggi dari pH normal akan menyebabkan spermatozoa lebih cepat mati (Suyadi *et al.* 2004). Sedangkan kualitas dan kuantitas semen segardipengaruhi oleh individu, bangsa, pakan, metode penampungan semen, manajemen pemeliharaan dan faktor lingkungan (suhu dan musim).

#### 2.1.1 Seminal Plasma

Seminal plasma merupakan sekresi fisiologis dari beberapa kelenjar saluran reproduksi jantan yang memiliki peranan penting dalam tahap maturasi akhir spermatozoa melalui mekanisme hormonal, enzimatis dan modifikasi permukaan sekaligus berfungsi sebagai sarana ejakulasi spermatozoa. Komposisi seminal plasma ditentukan oleh umur, kapasitas penyimpanan, dan organ sekretori pada saluran reproduksi jantan (Yanagimachi, 1994). Seminal plasma sapi yang berupa senyawa organik terdiri atas fruktosa, glukosa, asam sitrat, protein, lipid, kolesterol, dan asam glutamat sebagai komponen penting untuk sumber energi (Pineda, 2003). Senyawa anorganik diantaranya kalsium, kalium, klorin, magnesium, fosfor dan natrium (Andrabi, 2009) dan mengandung beberapa hormon (Hafez,



2000). Substansi hormon diantaranya testosteron, protaglandin, dan estrogen (Pineda, 2003).

Kandungan senyawa organik dan anorganik seminal plasma bervariasi antar spesies dan bahkan antar-individu. Hal tersebut disebabkan antara lain oleh jumlah dan ukuran kelenjar asesoris, ukuran epididimis dan testis (Hafez, 2000), umur, musim, dan level testosteron (Thontip, 2008). Seminal plasma mempunyai fungsi yaitu: (1) sebagai transportasi dari sistem reproduksi jantan pada saat ejakulasi, (2) menyediakan medium aktivitas sebelum spermatozoa non-motil, (3) sebagai *buffer* dan penyedia nutrisi untuk membantu kelangsungan hidup spermatozoa setelah dideposisikan ke dalam kelamin betina, (4) mencegah aktivasi primer selama transport fisiologi (Villemure *et al.*, 2003).

### 2.1.2 Spermatozoa

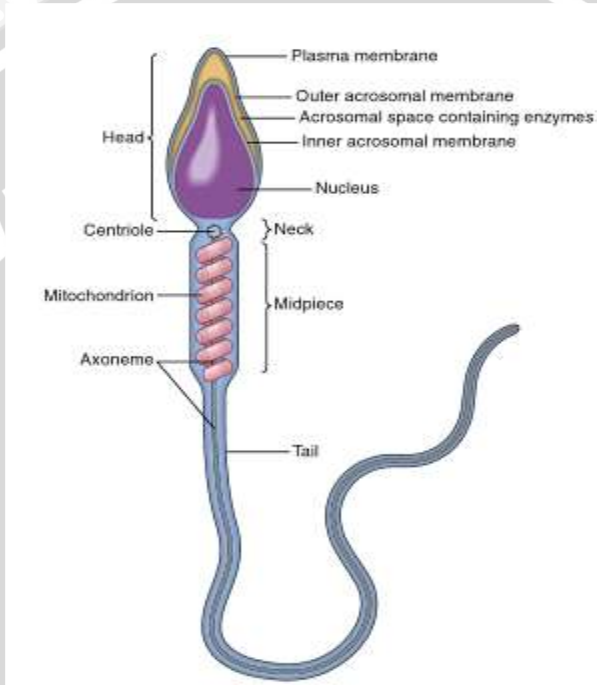
Spermatozoa merupakan sel kelamin jantan yang berasal dari sel germinal primordial (spermatogonia) yang mengalami spermatogenesis dan dibentuk dalam tubuli seminiferi testes. Proses spermatogenesis dimulai dari pembelahan mitosis spermatogonia (2n, 46 kromosom) menghasilkan spermatosit primer (2n). Spermatosit primer ini selanjutnya akan mengalami pembelahan meiosis yang pertama menghasilkan spermatosit sekunder (n). Pembelahan meiosis yang kedua pada spermatosit sekunder akan menghasilkan spermatid (n). Spermatid ini kemudian akan menjadi spermatozoa haploid (sel sperma) melalui proses spermiogenesis (Jones dan Kristin, 2013).

Spermatozoa terdiri dari bagian kepala, *midpiece* dan ekor (Garner dan Hafez, 2000). Kepala sperma berisi inti haploid yang dikelilingi oleh membran inti. Bagian luarnya dari inti adalah vesikel membran yang disebut akrosom. Akrosom ini menyelubungi bagian kepala sperma seperti topi. Leher sperma yang pendek diikuti dengan *midpiece*, terdiri atas mitokondria yang menyediakan energi untuk bergerak. *Midpiece* dan ekor sperma yang berbentuk seperti flagella, di dalamnya terdapat mikrotubulus yang berpola “9+2” (Jones dan Kristin, 2013).

Akrosom tipis menutupi bagian anterior kepala spermatozoa yang berisi bermacam-macam enzim hidrolitik antara lain proacrosin, hyaluronides, esterase dan asam hidrolase yang penting dalam proses fertilisasi. Akrosom terdiri dari bagian apikal (*apical ridge*),



principal, dan equatorial. Menurut Susilowati (2011) pada bagian apical dan principal segment diselubungi oleh membran yang disebut dengan akrosom. Membran akrosom ini berfungsi dalam proses kapasitasi, reaksi akrosom dan penembusan ovum ketika proses fertilisasi (Schatten dan Constantinescu, 2007).



**Gambar 2.1**Anatomi Spermatozoa(Jones dan Kristin, 2013)

Spermatozoa manusia memiliki morfologi yang ramping dengan panjang kurang lebih berkisar antara 60-70  $\mu\text{m}$  (Jones dan Kristin, 2013), bagian kepala berukuran kecil dan tertanam dalam sitoplasma sel sertoli sedangkan ekornya masuk ke dalam lumen tubulus seminiferus (Mariano, 1986). Aksonema terdiri atas 9 pasang mikrotubulus dikelilingi serabut kasar padat disekitar pusat filamen dibentuk pada bagian tengah ekor hingga seluruh tubuh spermatozoa. Di sekeliling aksonema dan serabut padat diselaputi oleh mitokondria yang pada membrannya tersusun atas pilinan. Mitokondria berfungsi sebagai penghasil energi yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa (Susilowati, 2011).

Komponen utama kepala spermatozoa berupa nukleus yang terdiri atas benang kromatin. Kromatin ini terdiri atas DNA (Ball dan Peters, 2004) dan protein–protein yang heterogen. Struktur kromatin yang rapi berfungsi dalam melindungi integritas genetik spermatozoa selama kopulasi (Fraser, 2004). Menurut Park dan Graham (1992), membran sel spermatozoa terdiri atas beberapa komponen utama diantaranya lipid 43%, protein 48% dan karbohidrat 9%.

## **2.2 Fisiologi Spermatozoa**

Dalam tubuli seminiferi, spermatozoa diproduksi dan akan dibawa ke dalam epididimis untuk menjalani proses pematangan akhir sebelum memiliki kemampuan bergerak dan membuahi oosit (Gamer dan Hafez, 2000). Selama proses pematangan spermatozoa dalam epididimis, terjadi perubahan komponen senyawa penyusun membran plasma yang mengakibatkan membran plasma kehilangan sebagian kolesterol dan meningkatkan nisbah antara asam lemak tak jenuh dan kolesterol. Dengan demikian membran plasma menjadi rapuh. Keadaan seperti inilah secara fisiologis yang dibutuhkan spermatozoa dalam proses kapasitasi (Nolan dan Hammerstedt, 1997).

Kapasitasi merupakan proses fisiologis yang terjadi sejak spermatozoa memasuki kanalis servikalis untuk menghilangkan penutup kepala spermatozoa dan membatasi gerakannya (Manuaba dkk., 2007). Proses kapasitasi yang terjadi diantaranya berupa aktivitas pemecahan parsial akrosom spermatozoa bagian luar dan membran plasma, penghilangan atau modifikasi molekul (glikoprotein) sehingga menyebabkan enzim akrosom dapat dilepaskan dan mampu menembus zona pelusida (Jones, 1991). Secara bertahap proses kapasitasi terdiri atas peningkatan fluiditas membran, efluk kolesterol, perubahan potensial membran, peningkatan protein tirosin fosforilasi, induksi hiperaktif, reaksi akrosom, perubahan kondisi protein fosforilasi, peningkatan pH intraseluler dan kadar kalsium (Visconti *et al.*, 1999)

## **2.3 Pengawetan Spermatozoa**

Semen yang didapatkan dari mamalia pejantan dapat langsung digunakan maupun disimpan sehingga dapat digunakan sewaktu-waktu. Penyimpanan semen yang baik adalah dilakukan dengan cara pembekuan. Pembekuan semen ini berpengaruh terhadap spermatozoa karena dapat menginduksi kerusakan yang bersifat permanen, akan

tetapi dapat dikurangi dengan cara menambahkan krioprotektan (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Krioprotektan berperan sebagai agen protektif yang ditambahkan ke dalam pengencer, yang terbagi menjadi dua macam: intraselular, merupakan agen yang dapat langsung masuk ke dalam sel karena larut dalam lemak dan ekstraselular, agen yang tidak dapat masuk ke dalam sel (Morel dan Mina, 2008). Beberapa yang termasuk dalam krioprotektan intraseluler diantaranya gliserol, etilen glikol dan DMSO (dimethyl sulfoxide) sedangkan yang termasuk dalam ekstraseluler yaitu lipoprotein sukrosa, rafinosa dan lain-lain (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Krioprotektan pada dasarnya berfungsi untuk mereduksi pengaruh letal pada proses pembekuan sel sehingga viabilitas sel tetap terjaga. Selain itu juga berfungsi untuk mencegah terbentuknya kristal-kristal es akibat dehidrasi sel yang berlebihan dari dalam sel dan menjaga kestabilan membran plasma sel sehingga kerusakan fisik dapat diminimalkan serta fungsional spermatozoa selama proses pembekuan dapat terjaga (Leibo, 1992).

Diantara krioprotektan yang sudah lama digunakan dalam pembekuan semen adalah gliserol. Gliserol berperan sebagai agen pelindung. Penambahan gliserol pada pengencer tris dan kuning telur dapat menghalangi terjadinya keretakan sel sehingga dapat menjaga spermatozoa dari efek mematikan (*lethal effect*) selama pembekuan (Mumu, 2009). Gliserol dapat mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan kristalisasi es pada titik beku larutan. Selain itu gliserol akan memodifikasi kristal es yang terbentuk di dalam medium pembekuan sehingga menghambat kerusakan sel secara mekanis (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Meskipun penggunaan gliserol pada proses pembekuan sebagai agen krioprotektan sangat penting bagi hidup sperma, namun dapat bersifat toksik bila digunakan secara berlebihan. Gliserol memungkinkan sperma dapat dibekukan dan disimpan pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  dan menekan terjadinya kerusakan enzim yang terdapat dalam spermatozoa yang penting dalam proses fertilisasi (Singh *et al.* 1996). Penurunan suhu, pembekuan dan penyimpanan pada suhu di bawah  $0^{\circ}\text{C}$  merupakan cara untuk pengawetan sperma dan memperpanjang daya hidup spermatozoa (Salamondan Maxwell, 1993).

## 2.4 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan atom atau gugus yang orbital bagian terluarnya memiliki elektron yang tidak berpasangan (*unpaired*

*electron*) (Sanocka dan Kurprize, 2004). Radikal bebas dapat terbentuk dalam tubuh sebagai bagian dari metabolisme sel normal sebagai reaksi redoks biokimia yang melibatkan oksigen dengan aktivitas penambahan satu elektron pada molekul oksigen, katekolamin yang merupakan molekul dalam tubuh dan bereaksi langsung dengan oksigen sehingga terbentuklah superoksida (Iwasaki dan Gagnon, 1992). Pada konsentrasi fisiologis sangat efektif dalam sinyal intrasel pada proses regulasi proliferasi sel, diferensiasi dan migrasi (Piantadosi, 2008). Selain itu, radikal bebas berperan sebagai mediator fungsi sperma normal diantaranya dalam mekanisme sinyal transduksi yang mempengaruhi fertilitas (Fialkow *et al.*, 1994).

Radikal bebas bersifat reaktif. Pada prinsipnya terdapat tiga mekanisme proses perusakan: reaksi tunggal, reaksi rantai dan mekanisme bercabang. Reaksi tunggal tidak menghasilkan kerusakan besar. Terjadi ketika radikal seperti radikal hidroksil bereaksi dengan biomolekul, sehingga akan terbentuk radikal lain. Radikal rantai terjadi dan akan berhenti ketika sebuah radikal bereaksi dengan radikal lain atau dengan ion logam transisi. Mekanisme berantai menyebabkan terjadinya kerusakan besar seperti halnya produksi superoksida yang menyebabkan peroksidasi lipid, terbentuknya alkenal sebagai produk dari proses oksidasi xanthine sehingga akan terbentuk superoksida berlebih dan terjadilah reaksi rantai (Bounds dan Winston, 1991). Radikal bebas dapat menyebabkan gangguan terhadap komponen sel yang penting untuk mempertahankan kehidupan seperti komponen fungsional (enzim dan DNA) maupun komponen struktural (molekul penyusun membran) (Iwasaki dan Ganon, 1992).

ROS merupakan senyawa pengoksidasi mencakup di dalamnya tidak hanya radikal oksigen diantaranya  $O_2^-$  dan  $OH^\cdot$ , tetapi juga beberapa turunan oksigen nonradikal antara lain hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), singlet oksigen dan asam hipoklorat (HOCl) (Halliwell, 2001). ROS dibentuk sebagai hasil reaksi enzimatik sinyal inter- dan intraseluler. Karena secara alami sifatnya yang sangat reaktif, ROS dapat dengan mudah bergabung dengan molekul lain, sehingga berpengaruh terhadap perubahan struktural dan fungsional menghasilkan kerusakan seluler (Agarwal *et al.*, 2005). Sasaran ROS adalah komponen lipid, protein dan DNA (Choudhary *et al.*, 2010).

Kelebihan produksi ROS ketika *thawing* akan merusak komponen sperma (Bilodeau *et al.*, 2002). Plasma membran dari spermatozoa mamalia yang kaya akan asam lemak tak jenuh mudah terserang ROS



yang berhubungan dengan peroksidasi lipid (Sanocka dan Kurpisz, 2004). Fosfolipid, glikolipid dan kolesterol adalah lapisan lipid penyusun membran sel. Asam arakhidonat dan asam lemak tak jenuh (*Polyunsaturated Fatty Acid* = PUFA) yang merupakan komponen fosfolipid dan glikolipid mudah mengalami oksidasi dan membentuk senyawa radikal alkil dan hidroperoksida lemak. Hidroperoksida lemak terdekomposisi menjadi radikal bebas hidroksil dan radikal alkosil dan kemudian radikal alkosil akan menjadi aldehid (MDA). Dampak dari radikal hidroksil dapat menimbulkan perubahan DNA berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan cincin purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA (Awda *et al*, 2009).



## BAB III METODOLOGI

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-April 2014 dan semen beku diambil dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari sedangkan evaluasi semen beserta analisa kadar MDA dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

### 3.2 Cara Kerja

#### 3.2.1 Persentase Viabilitas Spermatozoa

Semen beku yang didapatkan dari Balai Benih Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari dimasukkan dalam termos berisi nitrogen cair untuk dibawa menuju laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Universitas Brawijaya. Semen yang akan diperiksa terlebih dahulu *dithawing* yaitu dengan cara dimasukkan ke dalam *water bath* bersuhu 37-38<sup>0</sup>C selama 15 detik. Digunting kemasan semen beku pada ujung dan juga sedikit pada bagian tengahnya, kemudian ditetaskan (1 tetes) pada gelas objek yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% (Rosida, dkk. 2013).

Untuk mengetahui viabilitas sperma dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes semen pada gelas objek dan ditambahkan satu tetes larutan eosin negrosin. Dilakukan smear dan ditutup dengan kaca penutup untuk kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Diamati kurang lebih 200 spermatozoa dan dihitung spermatozoa yang hidup (tidak menyerap warna) dan spermatozoa yang mati (menyerap warna) kemudian dicari persentasenya (Partodiharjo, 1992).

$$\% \text{ Viabilitas Spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

#### 3.2.2 Analisa Kadar MDA

Semen beku yang akan dipreparasi terlebih dahulu di *thawing* yaitu dengan cara dimasukkan ke dalam *water bath* yang bersuhu 37-38<sup>0</sup>C selama 15 detik. Digunting kemasan semen beku pada ujung dan juga sedikit pada bagian tengahnya, kemudian ditetaskan pada *tube* (Rosida dkk. 2013). Untuk



memisahkan antara seminal plasma dengan spermatozoa pada semen beku dilakukan preparasi sperma menurut (Suleman *et al.*, 1996). Pelet dipisahkan dari seminal plasma dengan cara sentrifugasi pada 1800 x g selama 10 menit dan diresuspensi dalam 2 ml fosfat buffered saline (PBS, pH 7,2).

### **3.2.2.1 Pembuatan Kurva Standar**

Pemeriksaan kadar MDA dilakukan sesuai dengan metode berdasarkan Alvarez dan Storey (1995) yaitu 100ul kit MDA dengan konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7,8 mg/ml ditambahkan dengan 550 ml akuades, 100ul asam trikloroasetat 20% dan kemudian dilakukan homogenasi selama 30 detik. Ditambahkan dengan 250ul HCL 1N, dihomogenkan, ditambah 100ul natrium thiobarbiturat 1%, dihomogenkan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan diinkubasi pada penangas air 100°C selama 30 menit, dibiarkan pada suhu ruang. Sampel yang berubah warna diamati dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 533 nm. Diperoleh nilai absorbansi standar dan kurva standar MDA.

### **3.2.2.2 Pengukuran MDA Spermatozoa dan Seminal Plasma**

Kadar MDA seminal plasma dan spermatozoa diketahui dengan cara uji TBA menurut Morte *et al.* (2008). Masing-masing *tube* hasil preparasi (spermatozoa dan seminal plasma) sebanyak 450µl ditambahkan 2ml reagen TTH (18,8 ml TCA 40% dingin, 28,7 ml TBA 1%, 0,25N HCl). Dipanaskan dalam penangas air bersuhu 100°C selama 10 menit. Setelah dingin, disentrifugasi pada 1500x g selama 10 menit. Sampel yang telah berubah warna selanjutnya diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

### **3.2.2.3 Analisa Data**

Data berupa kadar MDA dan viabilitas dianalisis statistik dengan menggunakan uji-t berpasangan dengan taraf nyata 5% dan korelasi pearson menggunakan program SPSS 16.0.

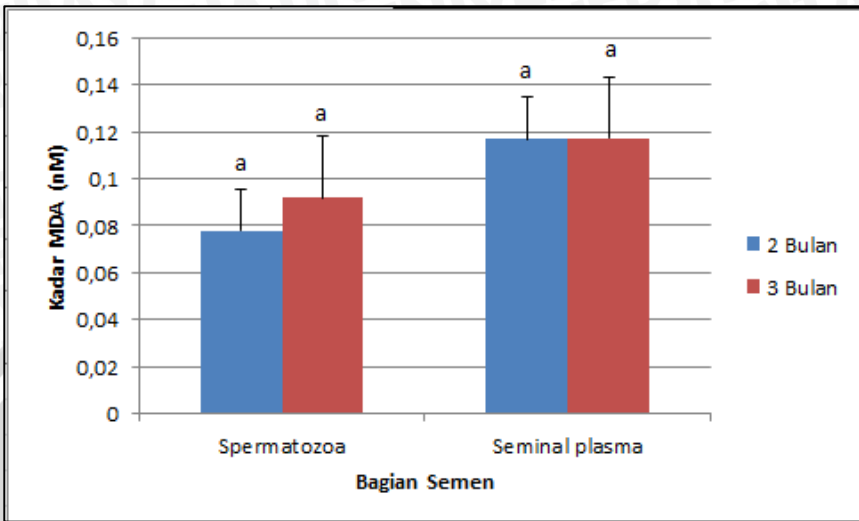
## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Kadar MDA Spermatozoa dan Seminal Plasma

Pengukuran kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma pada semen dengan pembekuan 2 bulan dan 3 bulan ditunjukkan pada tabel 4.1 dan gambar 4.1. Kadar MDA spermatozoa pada semen yang dibekukan selama 2 bulan adalah  $0,0777 \pm 0,008$  nM dan 3 bulan adalah  $0,0919 \pm 0,016$  nM. Berdasarkan hasil yang didapatkan, kadar MDA semen yang dibekukan selama 2 bulan berbeda dengan semen yang dibekukan selama 3 bulan, namun hasil analisis statistika menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $p < 0,05$ ). Kadar MDA seminal plasma pada semen yang dibekukan selama 2 bulan tidak berbeda nyata dengan kadar MDA seminal plasma pada semen yang dibekukan selama 3 bulan yaitu  $0,1168 \pm 0,018$  nM pada pembekuan 2 bulan dan  $0,1172 \pm 0,026$  nM pada pembekuan 3 bulan. Hasil berbeda ditemukan pada hasil penelitian kumaresan *et al.* (2008) bahwa pada pembekuan 0 jam kadar MDA spermatozoa adalah  $99,83 \pm 2,69$  (nM/10<sup>9</sup>) dan kadar MDA seminal plasma  $191,98 \pm 11,58$  nM yang meningkat tajam setelah 96 jam pembekuan. Hal ini menunjukkan bahwa lama pembekuan akan berpengaruh terhadap kadar MDA, di mana terdapat korelasi positif antara lama pembekuan dengan peningkatan kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma babi.

**Tabel 4.1** Kadar MDA Spermatozoa dan Seminal Plasma

	Kadar MDA Semen Beku (nM)	
	2 Bulan	3 Bulan
Spermatozoa	$0,0777 \pm 0,008$	$0,0919 \pm 0,016$
Seminal Plasma	$0,1168 \pm 0,018$	$0,1172 \pm 0,026$



**Gambar 4.1** Kadar MDA Seminal Plasma dan Spermatozoa Semen Beku dengan Lama Pembekuan 2 Bulan dan 3 Bulan

Penelitian sebelumnya oleh Partykaet *al.* (2007) berpendapat bahwa kadar MDA spermatozoa pada semen segar ayam hutan adalah  $0.28 \pm 0.11 \text{ nM}$   $\text{nmol}/50 \times 10^6$  spermatozoa dan pada semen beku (24 jam)  $0.33 \pm 0.11 \text{ nmol}/50 \times 10^6$  spermatozoa. Tingginya kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma setelah pembekuan diakibatkan oleh aktivitas ROS yang menyerang lipid pada membran spermatozoa pasca *thawing*. Adanya *cold shock* akan menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel. Membran akan kehilangan permeabilitasnya sehingga menyebabkan terlepasnya banyak komponen seluler diantaranya lipid, protein dan ion (Amann, 1999). Hal ini menyebabkan spermatozoa rentan terhadap serangan oksidatif dikarenakan besarnya jumlah asam lemak tak jenuh pada membrannya (Maldjian *et al.*, 2005). Selain itu seminal plasma sebagai sumber utama antioksidan untuk mekanisme pertahanan telah terpapar pada kondisi aerobik selama proses sebelum pembekuan. Sperma akan memiliki sedikit antioksidan untuk menjaga dari aktivitas ROS yang tidak menguntungkan. Sehingga mengakibatkan terjadinya stress oksidatif dan mengawali adanya peroksidasi lipid yang hasilnya dapat diketahui melalui terbentuknya MDA (Foote *et al.*, 2002). Menurut Gomez *et al.* (1998) potensial peroksidasi lipid (pembentukan MDA) berkorelasi positif dengan abnormalitas sel yang dapat dilihat dari morfologi dan

motilitasnya. Waktu penyimpanan sperma berpengaruh signifikan pada kualitas sperma setelah *thawing* (Chen *et al.*, 2010).

#### 4.2. Hubungan Antara Viabilitas dan Kadar MDA

Persentase viabilitas spermatozoa dapat dilihat dari jumlah spermatozoa hidup dibandingkan dengan spermatozoa yang mati dari 200 spermatozoa. Spermatozoa hidup dapat diketahui dengan melihat kepala spermatozoa berwarna putih sedangkan spermatozoa mati diketahui dengan melihat kepala spermatozoa berwarna ungu setelah diwarnai dengan eosin-negrosin. Hal ini disebabkan oleh membran kepala spermatozoa yang telah mati mengalami kerusakan sehingga permeabel terhadap pewarna eosin-negrosin.



**Gambar 4.2** Spermatozoa dengan Pewarnaan Eosin-Negrosin, Perbesaran 400x  
(A) Spermatozoa hidup (B) Spermatozoa mati

Viabilitas sperma semen beku dengan lama pembekuan 2 bulan dan 3 bulan setelah *thawing* ditunjukkan pada tabel 4.2. Dari tabel 4.2 dapat terlihat bahwa viabilitas spermatozoa semen beku dengan lama pembekuan 2 bulan dan 3 bulan tidak signifikan, yakni  $64 \pm 1,29$  nM pada semen beku 2 bulan dan pada semen beku 3 bulan sebesar  $45,0 \pm 1,40$  nM. Hasil analisis dengan menggunakan spss 16.0 menunjukkan bahwa terdapat korelasi negatif sangat kuat antara

viabilitas dan kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma. Semakin tinggi viabilitas, semakin rendah kadar MDA spermatozoa dan seminal plasmanya. Hal ini sesuai dengan pendapat Guthrie dan Welch (2012) yang menyebutkan bahwa terdapat korelasi negatif antara viabilitas sperma dan kadar MDA semen babi.

**Tabel 4.2** Hubungan antara Viabilitas dan Kadar MDA

Lama Pembekuan	Viabilitas (%)	MDA spermatozoa (nM)	MDA seminal plasma (nM)
2 Bulan	64±1,29	0,0777±0,008	0,0919±0,016
3 Bulan	45,0±1,40	0,0919±0,016	0,1172±0,026

Hasil penelitian Martorana dan Kelly (2013) membuktikan bahwa semakin besar motilitas dan viabilitas sperma menunjukkan semakin kecil peroksidasi lipid yang terjadi. Hasil ini kurang sesuai dengan yang tertulis pada tabel 4.2. Tidak terdapat perbedaan antara viabilitas spermatozoa pada semen yang dibekukan 2 bulan dan semen yang dibekukan 3 bulan. Sebuah studi menunjukkan bahwa proses pembekuan dan *thawing* pada sperma manusia dapat menyebabkan menurunnya morfologi sperma, motilitas dan viabilitas (O'Connell *et al.*, 2002).

Pembekuan semen menyebabkan kerusakan ultrastruktural, biokemikal dan fungsional pada spermatozoa (Leboeuf *et al.*, 2000). Berbagai organel sperma diketahui rentan terhadap efek pembekuan diantaranya induksi reaksi akrosomal dini, perubahan fungsi mitokondria, kegagalan dekondensasi kromatin sehingga dapat berpengaruh pada viabilitas dan fertilitas sel sperma (Watson, 2000). Terjadinya kerusakan ini oleh karena terbentuknya kristal es ekstraseluler dari air dalam medium. Pembentukan kristal es ekstraseluler ini dapat meningkatkan konsentrasi terlarut diantaranya gula, garam dan protein. Dalam menghadapi tekanan gradien osmotik dan adanya fakta bahwa air dalam spermatozoa lebih lambat membentuk kristal es daripada air dalam medium, air akan dikeluarkan dari spermatozoa terutama dari bagian kepala melewati plasma membran semi-permeabel dan mengakibatkan spermatozoa menjadi dehidrasi (Andrabi, 2007).

Plasma membran spermatozoa rentan terhadap peroksidasi lipid oleh aktivitas ROS. Proses peroksidasi lipid ini terjadi pemecahan asam lemak tak jenuh (PUFA) sebagai penyusun terbesar membran plasma



yang mengelilingi sel dan organel sel. PUFA terutama terletak dalam fosfolipid membran plasma spermatozoa dan rentan terhadap serangan ROS (Drevet, 2006). Untuk menanggulangi efek kerusakan dari ROS, berbagai macam antioksidan telah tersedia dalam seminal plasma dan spermatozoa (Lewiset *al.*, 1997).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Pembekuan semen selama 2 bulan dan 3 bulan menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada kadar MDA spermatozoa dan seminal plasma.
2. Terdapat korelasi negatif antara viabilitas dan kadar MDA seminal plasma dan spermatozoa. Semakin kecil viabilitas spermatozoa, semakin besar kadar MDanya.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar MDA semen beku dengan lama pembekuan lebih panjang dan dibandingkan dengan kadar MDA semen segar



## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., & Prabakaran S.A. 2005. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol.* 43(11): 963–974
- Aitken, R.J., Buckingham D.W., Carreras A. & Irvine D.S. 1996. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationships with cellular composition, oxidative stress and sperm function. *Free Radical Biology and Medicine.* 21:495–504
- Alvarez, J.G. & Storey B.T. 1995. Differential Incorporation of Fatty Acids Into and Peroxidative Loss of Fatty Acids from Phospholipids of Human Spermatozoa *Mol. Reprod. Dev.* 42:334-345
- Amann, R.P. 1999. Cryopreservation of sperm. *Encyclopedia Reprod* 1(7):73–83
- Andrabi, S.M.H. 2007. Fundamental Principles of Cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* Bull Spermatozoa. Mini review. *Int. J. Agri. and Biol.* 9:367-369
- Andrabi, S.M.H. 2009. Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 44:552–569
- Awda, Basim J., Meghan Mackenzie-Bell & Marry M. Buhr. 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sper Function. *Journal Biolreprod.* 81:553 – 561.
- Ball, P.J.H & Peters A.R. 2004. **Reproduction in Cattle.** Oxford USA. Ed ke-3. Blackwell Publishing.
- Bilodeau, J.F., Chatterjee S., Sirard M.A & Gagnon C. 2000. Level of Antioxidant Defenses are Decreased in Bovine Spermatozoa after a Cycle of Freezing and Thawing. *Mol Reprod Dev.* 55: 282-288.
- Boitrelle, F., Martine A., Claire T., Fatma F., Marianne B., Franc Ois V., Robert W., Marc B. & Jacqueline S. 2012. Cryopreservation of Human Spermatozoa Decreases the Number of Motile Normal Spermatozoa, Induces Nuclear Vacuolization and Chromatin Decondensation. *Journal of Andrology.* 33(6): 1371-1378.

- Bounds, P.L. & Winston, G.W. 1991. The reaction of xanthine oxidase with aldehyc products of lipid peroxidation. *Free Radical Biol.Med.* 11:447-453
- Chen, Y. K., Qing Hua Liu, Jun Li, Zhi Zhong Xiao, Shi Hong Xu, Xue Hui Shi & Dao Yuan Ma. 2010. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Cryobiology.* 61:189-193
- Choudhary, R.V.K Chawala, N.D. Soni, Jayant Kumar & R.K. Vyas. 2010. Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. *Pak J Physiol:* 6(2)
- Cummins, J.M., Jequier A.M.&Kan R. 1994. Molecular Biology of Human Male Infertility: Links with Aging, Mitochondrial Genetics and Oxidative Stress. *Mol Reprod Dev.* 37:345-62
- de Lamirande, E. & Gagnon C. 1993. Human Sperm Hyperactivation and Capacitation as Parts of an Oxidative Process. *Free Radic Biol Med.* 14:255–265.
- Drevet, J.R. 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* 250:70–79.
- Ferramosca, A. & Vincenzo Zara. 2014. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. Rev. Article. *BioMed Research International.* [Http://dx.doi.org/10.1155/2014/902953](http://dx.doi.org/10.1155/2014/902953). Diakses pada tanggal 19 Juli 2014.
- Fialkow, L, Chan C.K, Rotin D., Grinstein S & Downey G.P. 1994. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. *J Biol Chem* 269:31234-31242.
- Foote, R.H., Brockett, C.C. & Kaproth, M.T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci.* 71(1-2):13-23
- Garner, D.L. & Hafez ESE. 2000. **Spermatozoa and Seminal Plasma**. In: Hafez B, Hafez ESE, editor. *Reproduction in Farm Animals*. Seventh Ed. South Carolina: Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. Pp 96-109.
- Gomez, E., Irvine, D.S. & Aitken, R.J. 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. Andro.* 21:81–94.

- Guthrie, H.D. & Welch, G.R. 2012. Effects of reactive oxygen species action on sperm function in spermatozoa. *Theriogenology*. 78(8):1700-1708
- Hafez, E. S. E. 2000. **Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals 7th edition**. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland, USA.
- Hafez, E.S.E. 2004. **X-and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa. In Reproduction in Farm Animal. 8th ed.** Lea and Febiger Philadelphia, USA
- Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 18:685-716.
- Herrero, M.B., de Lamirande E. & Gagnon C. 1999. Nitric Oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein-Tyrosine Phosphorylation in Vitro. *Biology of Reproduction* 61. 575-581.
- Holt, W.V. 2000. Basic Aspects of Frozen Storage of Semen. *Animal Reproduction Science*, v.62. p.3-22.  
<http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue2/art-08.html>.  
Diakses pada tanggal 16 Juli 2014.
- ISAA. 2013. Pocket K No. 40: Biotechnology for the Livestock Industry. <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/40/default.asp>. Diakses pada tanggal 24 Desember 2013.
- Iwasaki, A. & Gagnon C., 1992. Formation Of Reactive Oxygen Species in spermatozoa of Interfile Patients. *Fertil Steril* 57: 409-416.
- Jones, E. R. 1991. **Human Reproductive Biology**. Academic Press: California
- Jones E. R. & Kristin H. L. 2013. **Human Reproductive Biology**. 4th ed. Academic press. USA.
- Kumaresan, A., G. Kadirvel, K.M. Bujarbaruah, R.K. Bardoloi, Anubrata Das, Satish Kumar, S. & Naskar. 2008. Preservation of Boar Semen at 18°C Induces Lipid Peroxidation and Apoptosis like Changes in Spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.006
- Leboeuf, B., Restall, B. & Salamon, S. 2000. Production and Storage of Goat Semen for Artificial Insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 6 :113-141.

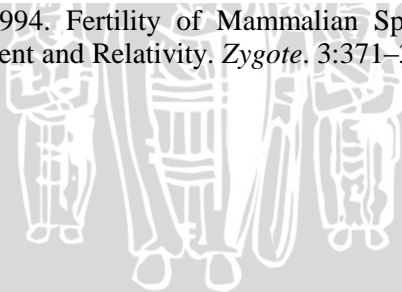


- Leibo, T. 1992. A One-Step Method for Direct non-Surgical Transfer on Frozen-Thawed Bovine Embryos. *Theriogenology* 21: 767–787.
- Lewis, S.E., Sterling, E.S., Young, I.S., & Thompson, W. 1997. Comparison of Individual Antioxidants of Sperm and Seminal Plasma in Fertile and Infertile Men. *Fertility and Sterility*. 67:142–147
- Maldjian, A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini S. & Penny P. 2005. Changes in Sperm Quality and Lipid Composition During Cryopreservation of Boar Semen. *Theriogenology*. 63(2): 411–421.
- Manuaba, I.B.G., I.A. Chandranita Manuaba, & I.B.G. Fajar Manuaba. 2007. **Pengantar Kuliah Obstetri** Edisi 1. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Mariano, S. H. 1986. **Histologi Manusia**. Edisi V. EGC. Jakarta.
- Martorana & Kelly, M.S. 2014. Oxidative Studies in Cryopreserved Mammalian Spermatozoa. Dissertation and Thesis. <http://gradworks.umi.com/15/53/1553358.html>. Diakses pada tanggal 19 Juli 2014
- Morte, M.I., Ana M.R., Diana S., Ana S.R., Sandra G. & Joao R.S. 2008. The Quantification of Lipid and Protein Oxidation in Stallion Spermatozoa and Seminal Plasma: Seasonal Distinctions and Correlations With DNA Strand Break. *Animal Reproduction Science* 106 :36–47.
- Morel, D. & Mina C.G. 2004. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Study Management**. 3rd Ed. Cambridge University Press. Cambridge.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Jurnal Agroland* (16)2: 172-179
- Nolan, J.P. & R.H. Hammerstedt. 1997 . Regulation of Membrane Stability and the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Faseb J*.11 : 670-682.
- O'Connell, M., N. McClure, &S.E. Lewis. 2002. The Effects of Cryopreservation on Sperm Morphology, Motility and Mitochondrial Function. *Hum.Reprod.* 17(3): 704-709.
- Park, J.E. & Graham J.K. 1992. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *J. Theriogenology*. 38: 209-222.



- Partodihardjo, S. 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Ed. Ke-3. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Partyka, Agnieszka, Anna J. & Przemysław P. 2007. Lipid Peroxidation in Fresh and Stored Semen of Green-Legged Partridge. *Electronic Journal of Polish Agricultural University*. 10(2),#08. <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue2/art-08.html>. Diakses pada tanggal 20 Juli 2014
- Piantadosi, C.A. 2008. Carbon Monoxide, Reactive Oxygen Signaling, and Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine* 45:562-569.
- Pineda, M.H. 2003. **Male reproductive system**. In: Pineda MH, Dooley MP, eds. McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction. 5th ed. Ames, IA. Iowa State Press.
- Rath, D., Bathgate R., Rodriguez-Martinez H., Roca J., Strzezek J. & Waberski D. 2009. Recent Advances in Boar Semen Cryopreservation. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 66:51-66.
- Rosida, A., Husni A., Sri H. & Pudji S. 2013. Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawa dalam Berbagai Macam Pengencer. *Veterinary Medica*. 6(1): 69-74.
- Said, S., Gunawan M., Kaiin E.M. & Tappa B. 2005. Daya Tahan Sperma Cair Sapi Simental yang Disimpan dalam Straw pada Temperatur 5°C. Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI. *Buletin Peternakan*. 16:58-73.
- Salamon, S. & Maxwell, W.M.C. 1993. Liquid Storage of Ram Semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:613-638.
- Sanocka, D. & Kurpisz M. 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *Reprod Biol Endocrinol* . 2:12-19.
- Sanocka, D., Fraczek M., Jedrzejczak P., Szumala-Kakol A., Kurpisz M. 2004. Male Genital Tract Infection: an Influence of Leukocytes and Bacteria on Semen. *J Reprod Immunol*. 62: 111-124.
- Schatten, H. & Constantinescu, G. M. 2007. **Comparative Reproductive Biology**. Blackwell Publishing. Iowa.
- Singh, M.P., A.K. Sinha, B.K. Singh & R.L. Prasad. 1996. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membrane. *Theriogenology*. 38: 209-222.
- Supriatna, I., & F. Pasaribu. 1992. **Invitrofertilization, transfer embrio dan pembekuan embrio**. PAU-IPB. Bogor.

- Susilowati, Trinil. 2011. **Spermatology**. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Suyadi T. Susilawati & Isnaini N. 2004. Uji Pembekuan Semen Kambing Boer. **Laporan Penelitian**. Kerjasama Dinas Peternakan-Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Toelihere, M. R 1985. **Fisiologi Reproduksi Pada Ternak**. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Toelihere, M. R.1993. **Inseminasi Buatan Pada Ternak**. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Togun, V. A. & Egbunike, G. N. 2006. Seasonal Variations in the Sperm Production Characteristics of Zebu (*Whitefulani*) Cattle Genitalia in the Humid Tropical Environment. *Middle-East J. Sci. Res.* 1(1):87-95
- Villemure, M., Lazure C. & Manjunath P. 2003. Isolation and Characterization of Gelatin-Binding Proteins from Goat Seminal Plasma. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:39–48.
- Visconti, P.E., Stewart-Savage J., Blasco A., Battaglia L., Miranda P., Kopf G.S. & Tezo'n J.G. 1999. Roles of Bicarbonate, cAMP, and Protein Tyrosine Phosphorylation on Capacitation and the Spontaneous Acrosome Reaction of Hamster Sperm. *Biology of Reproduction.* 61:76–84.
- Watson, P.F. 2000. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreservation Semen. *Animal Reproduction Science.* 60–61: 481–492.
- Yanagimachi, R. 1994. Fertility of Mammalian Spermatozoa: Its Development and Relativity. *Zygote.* 3:371–372



## LAMPIRAN

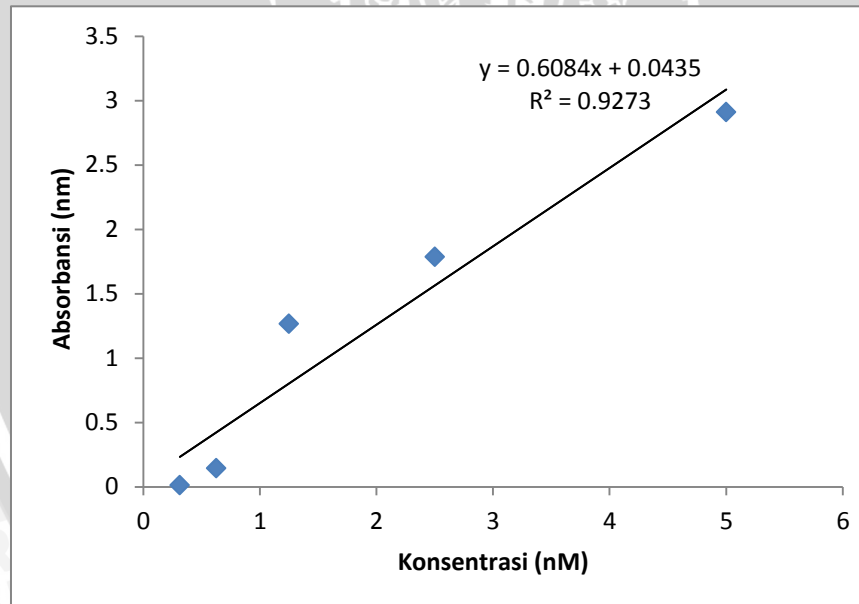
### Lampiran 1. Analisis Statistika Kurva Standar

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,949603
R Square	0,901746
Adjusted R Square	0,852619
Standard Error	0,33199
Observations	4

ANOVA						
	<i>Df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	2,023078	2,023078	18,35536	0,05	
Residual	2	0,220435	0,110217			
Total	3	2,243513				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	
Intercept	-0,194426	0,285421	-0,68061	0,566342	-1,42233	

<i>Upper</i> 95%	<i>Lower</i> 95,0%	<i>Upper</i> 95,0%
1,033805	-1,42233	1,033805
1,701358	-0,00363	1,701358

## Lampiran 2. Grafik Kurva Standar



### Lampiran 3. Normalitas Data MDA Spermatozoa

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MDA_spermatozoa2	MDA_spermatozoa3
N		5	5
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.077692	.091926
	Std. Deviation	.0081107	.0158656
Most Extreme	Absolute	.324	.244
Differences	Positive	.217	.200
	Negative	-.324	-.244
Kolmogorov-Smirnov Z		.724	.546
Asymp. Sig. (2-tailed)		.670	.926
a. Test distribution is Normal.			



#### Lampiran 4. Hasil Uji T Berpasangan MDA Spermatozoa

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	MDA_Spermatozoa2	.077692	5	.0081107	.0036272
	MDA_Spermatozoa3	.091930	5	.0158677	.0070962

Paired Samples Correlations				
		N	Correlation	Sig.
Pair 1	MDA_Spermatozoa2 & MDA_Spermatozoa3	5	-.157	.801

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 MDA_Spermstozoa 2	-							
MDA_Spermstozoa 3	1.4238000E-2	.0189183	.0084605	-.0377282	.0092522	-1.683	4	.168



## Lampiran 5. Normalitas Data MDA Seminal Plasma

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			MDA_seminalplasma2	MDA_seminalplasma3
N			5	5
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean		.116874	.117240
	Std. Deviation		.0184276	.0261465
Most Extreme Differences	Absolute		.249	.139
	Positive		.249	.139
	Negative		-.139	-.136
Kolmogorov-Smirnov Z			.557	.312
Asymp. Sig. (2-tailed)			.916	1.000
a. Test distribution is Normal.				

## Lampiran 6. Hasil Uji T Berpasangan MDASeminal Plasma

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	MDA_SeminalPlasma2	.116874	5	.0184276	.0082411
	MDA_SeminalPlasma3	.117240	5	.0261465	.0116931

Paired Samples Correlations				
		N	Correlation	Sig.
Pair 1	MDA_SeminalPlasma2 & MDA_SeminalPlasma3	5	-.273	.656

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 MDA_SeminalPlasma2 - MDA_SeminalPlasma3	3.660000 0E-4	.0358699	.0160415	-.0449043	.0441723	-.023	4	.983





## Lampiran 7. Normalitas Data Viabilitas Semen Beku 2 Bulan dan 3 Bulan

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			
		Viabilitas2	Viabilitas3
N		5	5
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	64.0000	45.0000
	Std. Deviation	12.94218	14.08900
Most Extreme Differences	Absolute	.306	.265
	Positive	.220	.265
	Negative	-.306	-.160
Kolmogorov-Smirnov Z		.684	.592
Asymp. Sig. (2-tailed)		.738	.874
a. Test distribution is Normal.			

### Lampiran 8. Hasil Uji T Berpasangan ViabilitasSemen Beku 2 Bulan dan 3 Bulan

**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Viabilitas2	64.0000	5	12.94218	5.78792
	Viabilitas3	45.0000	5	14.08900	6.30079

**Paired Samples Correlations**

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Viabilitas2 & Viabilitas3	5	.213	.731

**Paired Samples Test**

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Viabilitas2 - Viabilitas3	1.9000E1	16.98529	7.59605	-2.09002	40.09002	2.501	4	.067

**Lampiran 9. Hasil Uji Korelasi antara Viabilitas Semen beku dan Kadar MDASpermatozoa**

<b>Correlations</b>			
		viabilitas	Mdaspermatozoa
viabilitas	Pearson Correlation	1	-1.000**
	Sig. (2-tailed)		.
	N	2	2
mdaspermatozoa	Pearson Correlation	-1.000**	1
	Sig. (2-tailed)	.	
	N	2	2

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

**Lampiran 10. Hasil Uji Korelasi antara Viabilitas Semen beku dan Kadar MDA Seminal plasma**

<b>Correlations</b>			
		viabilitas	Mda
viabilitas	Pearson Correlation	1	-1.000**
	Sig. (2-tailed)	.	.
	N	2	2
mda	Pearson Correlation	-1.000**	1
	Sig. (2-tailed)	.	.
	N	2	2

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