

## Kompleks Insulin Like Growth *Factor-I* Mempengaruhi Persentase Membran Plasma Utuh dan Kadar Malondialdehid Spermatozoa

(*INSULIN LIKE GROWTH FACTOR-1 COMPLEX INFLUENCE THE PERCENTAGE  
INTACT MEMBRANE PLASMA AND LEVEL OF MALONDIALDEHIDE IN SPERM*)

Suherni Susilowati

Departemen Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Airlangga, Kampus-C Unair Jl Mulyorejo, Surabaya 60115  
Telpon : 031-5927832. e-mail : scorpios\_girl88@yahoo.co.id

### ABSTRACT

The aim of this study is to observe the effect of insulin like growth factor-1 complex (IGF-1 complex) towards the level of malondialdehyde (MDA) and percentage of intact membrane plasma. Previous report suggested that seminal plasma of several animal species contains factor namely IGF-1 complex that may influence sperm viability and motility. This protein complex is produced by Leydig and Sertoli cells. Goat semen were collected using artificial vagina, then its motility and viability were checked. Identification of IGF-1 complex were done by Nahve-PAGE 12% technique. Following this, the IGF-1 complex were isolated using electro elusion method. The seminal plasma IGF-1 complex has a molecular weight of 150,288 kDa. In order to observe the effect of IGF-1 complex on the level of MDA and intact membrane plasma, semen were divided into 3 treatment group : group (1) semen at  $3.10^6$  spermatozoa + Bracket and Oliphan's medium; group (2) semen at  $3.10^6$  spermatozoa + Bracket and Oliphan's medium + IGF-1 complex; and group (3) semen at  $3.10^6$  spermatozoa + IGF-1 complex only; respectively. Following all treatment, groups were leave at room temperature for 45 minutes. Result indicated that the highest percentage intact membrane plasma was observe in semen treated with IGF-1 complex whilst the lowest MDA level was also observe in this group. In conclusion IGF-1 complex significantly influence the percentage intact membrane plasma and level of MDA in sperm.

Key words : seminal plasma, IGF-1 complex, malondialdehyde, intact membrane plasma.

### PENDAHULUAN

*Insulin like growth factor-I complex* mempunyai sifat *dependent* dan bersirkulasi di dalam darah membentuk ikatan kompleks yang terdiri dari *insulin like growth factor-I* (IGF-I), *insulin like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3) dan *acid label subunit* (ALS) dengan berat molekul kurang lebih 150 kDa (Barreca *et al.*, 1995). Di dalam plasma semen IGF-I telah diidentifikasi di dalam testis yang disekresi oleh sel leydig dan sel sertoli (Roser dan Hess, 2001). IGF-I yang disekresi dalam plasma seminalis diproduksi oleh sel-sel sertoli dan tidak dapat melalui *blood testis barrier*, dalam hal ini bertindak sebagai parakrin yang berpengaruh terhadap perubahan epitel germinalis sampai menjadi spermatosit. IGF-I juga diproduksi oleh sel-sel granulosa pada tikus yang bertindak sebagai parakrin dan diproduksi oleh sel-sel teka eksterna dari sel granulosa pada sapi. Hal

tersebut berbeda dengan IGF-II tidak diproduksi oleh sel-sel sertoli mau pun sel-sel granulosa (Donal's, 2003). Reseptor IGF-I telah diidentifikasi pada sel sertoli, sel leydig, spermatosit II, spermatid, dan spermatozoa (Macpherson *et al.*, 2002). Hasil penelitian Donald *et al.*, (1998), membuktikan bahwa reseptor IGF-I yang utama terletak pada daerah akrosom membran spermatozoa. Pada spesies primata tingkat tinggi, kompleks protein IGF tersebut ditemukan di cairan amnion, cairan serebrospinal, dan plasma seminalis (Baxter, 1990).

Teknik manipulasi *in vitro* spermatozoa salah satunya adalah metode sentrifugasi. Sentrifugasi semen diperlukan terutama untuk proses teknologi bantu reproduksi yang bertujuan untuk membantu proses reproduksi dengan cara mempertemukan spermatozoa kualitas tinggi dengan sel telur, sehingga terjadi fertilisasi. Dampak buruk dari hasil sentrifugasi

adalah adanya peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) oleh spermatozoa. Berbagai proses biologis dapat menjadi modulator pembentukan ROS oleh spermatozoa, di antaranya kerusakan mekanik pada membran spermatozoa dan terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa (Aitken dan Clarkson, 1990; Iwazaki dan Gagnon, 1992). ROS dalam konsentrasi normal diperlukan sebagai mediator penting terhadap fungsi spermatozoa dan terlibat dalam induksi hiperaktivasi, kapasitas, dan reaksi akrosom serta fusi spermatozoa dengan sel telur (Dorota dan Kurpisz, 2004). Namun, bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralkan oleh sistem pertahanan, antioksidan yang ada pada spermatozoa atau plasma seminalis dapat menyebabkan kerusakan asam lemak, khususnya asam lemak poli tak jenuh yang merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran spermatozoa, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA, selanjutnya menyebabkan penurunan motilitas, dan kematian spermatozoa (Alvarez dan Storey, 1995).

Malondialdehid (MDA) kadang disebut malonaldehid, merupakan salah satu golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi asam lemak poli tak jenuh yang mempunyai ikatan rangkap lebih. Peningkatan kadar MDA dalam suspensi lazim digunakan sebagai salah satu indikator untuk peroksidasi lipid membran (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Berdasarkan uraian di atas maka penelitian ini mengkaji *IGF-I* terhadap hubungan kadar MDA dengan membran plasma utuh (MPU) spermatozoa

## METODE PENELITIAN

### Koleksi Semen dan Purifikasi Protein

Semen ditampung dari kambing jantan peranakan etawa dengan menggunakan vagina buatan. Penampungan semen dilakukan pada waktu pagi hari sekitar pukul 08.00-09.00. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan secara makroskopis (volume, bau, warna, pH, dan konsistensi) dan secara mikroskopis (motilitas, viabilitas, konsentrasi). Semen tersebut ditambah dengan *phosphat buffer saline* (PBS) kemudian disentrifugasi pada suhu 5°C dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, kemudian supernatannya (plasma semen) diambil dengan mikropipet, dimasukkan ke dalam tabung ependorf. Purifikasi dilakukan dengan cara menambahkan PBS dan *phenylmethanesulfonyl fluoride* (PMSF) kemudian dihomogenkan

selama 5–10 menit pada suhu 4°C kemudian dihomogenkan lagi dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatannya diambil dan ditambah dengan etanol absolut dengan perbandingan 1:1, selanjutnya diendapkan semalam (sampai tidak bau etanol), etanolnya dibuang kemudian peletnya ditambah dengan Tris HCl dengan 1-2 kali volume pelet (Aulani'am, 2005)

### Identifikasi Protein *Insulin Like Growth Factor-I* Complex dengan Metode *Native-PAGE*

Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). *Separating gel* dimasukkan ke dalam *plate* menggunakan mikropipet. Permukaan dilapisi dengan menambahkan akuades dan dibiarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel. Selanjutnya *stacking gel* dituangkan di atas *separating gel* yang telah memadat, setelah itu dipasang sisir untuk membentuk sumuran dan didiamkan selama 30 menit. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati. *Plate* dipasang pada alat *electrophoresis* dan berikutnya *buffer* PBS dituangkan pada *chamber electrophoresis*.

15µl sampel ditambah 15µl non-RSB (*Non Reducing Sample Buffer*) dimasukkan ke dalam tabung *ependorf*, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 3 menit. Setelah dingin sampel diambil sebanyak 15 µl dimasukkan dalam tiap-tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama dengan sampel. Setelah itu anoda dihubungkan pada *reservoir* bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA, 130 V selama 1 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian ± 0,05 cm dari batas bawah plat gel. Plat dibuka dan gel diambil untuk dilakukan pewarnaan dan pencucian gel.

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining coomassie blue* R-250 selama 30-60 menit. Kemudian dilakukan penghilangan warna dengan merendam gel dalam larutan *destaining* dan digoyang secara otomatis sampai gel menjadi jernih dan hasil *electrophoresis* difoto atau *discan* (Aulani'am, 2005). Selanjutnya untuk mengetahui berat molekul *band-band* yang terbentuk, dilakukan perhitungan berat molekul dengan menghitung nilai *Rf* dari masing-masing *band*.

### Isolasi Protein *Insulin Like Growth Complex* dengan Metode Elektroelusi

Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan *band* pada gel *Native-PAGE* ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap dijaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian atas dan bawah selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat *electrophoresis horizontal (Bio-Rad)*. Alat *electrophoresis* diisi dengan buffer sebanyak 500 ml dalam posisi buffer melebihi kawat. *Running* elektroelusi dilakukan pada kondisi 130 volt, 30 mA selama 1 jam. Cairan hasil elektroelusi ditampung dalam tabung *ependorf*, disimpan pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$ , siap dipakai untuk penelitian berikutnya (Aulani'am, 2005).

### Pengujian Membran Plasma Spermatozoa dengan (*Hypoosmotic Swelling Test*)

Spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar, karena membran plasma spermatozoa masih berfungsi dengan baik dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Spermatozoa yang membrannya rusak ditandai dengan ekor yang lurus. Sebanyak 1 ml larutan hipoosmotik (7,35 gram Na sitrat 2 H<sub>2</sub>O, 13,52 g fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml akuades) ditambah dengan 0,1 ml spermatozoa, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

### Pemeriksaan Kadar MDA Spermatozoa

Pemeriksaan kadar MDA pada penelitian ini dilakukan menggunakan modifikasi metode test *thiobarbiturat acid* (TBA) yang dikembangkan oleh Alvarez dan Storey (1995). Sebanyak 100 $\mu\text{l}$  kit MDA dengan konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7,8,0 mg/ml kemudian ditambahkan 550ml akuades dan 100 $\mu\text{l}$  asam trikloroasetat 20% dan dilakukan homogenasi selama 30 detik, kemudian ditambahkan dengan 250 $\mu\text{l}$  HCL 1N, dihomogenkan, ditambah 100 $\mu\text{l}$  natrium thiobarbiturat 1%, dihomogenkan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil diinkubasi pada penangas air  $100^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, dibiarkan pada suhu ruangan. Serapan warnanya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 533 nm. Diperoleh nilai absorbansi standar dan kurva standar MDA.

Analisis MDA pada sampel adalah sebagai berikut : 20 ml supernatan ditambah dengan

80ml Tris HCl. ditambahkan 550 ml akuades dan 100  $\mu\text{l}$  asam trikloroasetat 20% dan divortek selama 30 detik, dihomogenkan, kemudian ditambahkan dengan 250 $\mu\text{l}$  HCl, dihomogenkan, ditambah 100 $\mu\text{l}$  natrium thiobarbiturat 1%, dihomogenkan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan diinkubasi pada penangas  $100^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, dibiarkan pada suhu ruangan. Serapan warnanya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 533 nm. Penilaian kadar MDA dilakukan dengan cara mengkonversikan nilai hasil pengukuran absorbansi dengan nilai kurva baku standar MDA murni dalam berbagai konsentrasi. Selanjutnya nilai hasil perkalian pada kurva standar baku, dikalikan lagi dengan faktor pengenceran yang digunakan. Konsentrasi MDA diukur berdasarkan jumlah  $\mu\text{g}$  atau nmol atau ppm MDA pada setiap ml suspensi spermatozoa

## HASIL DAN PEMBAHASAN

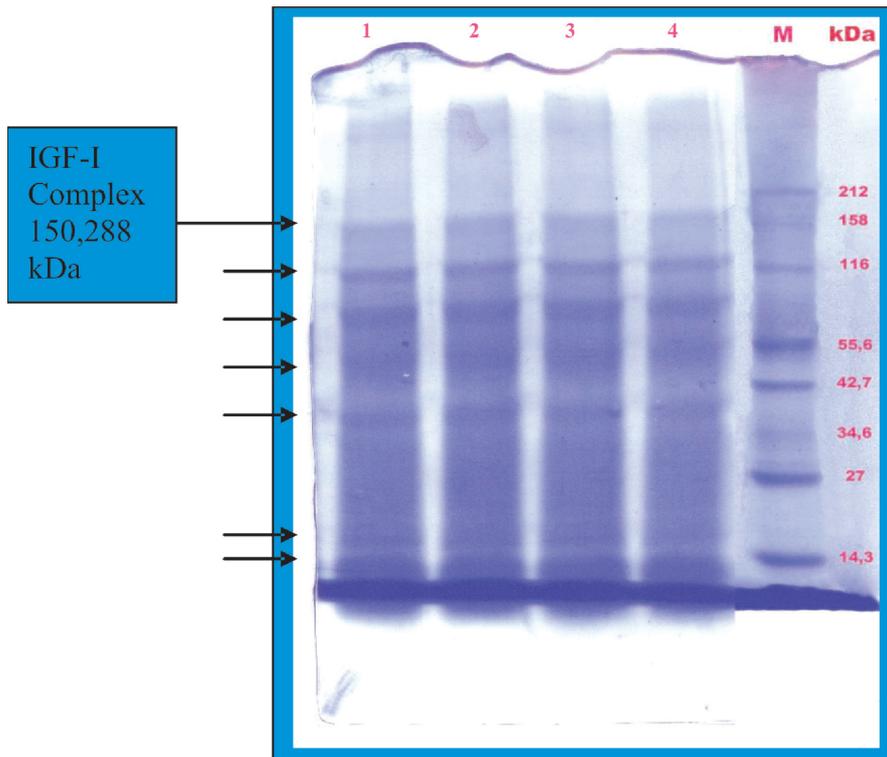
### Native-PAGE plasma seminalis kambing peranakan ettawa

Identifikasi fraksi protein plasma seminalis kambing peranakan ettawa dilakukan dengan *native-PAGE (native-polyacrylamid gel electrophoresis)* konsentrasi 12% dalam *elektrophoresis set mini protein gel* (Bio Rad). Sebagai *marker* digunakan *high range SDS-PAGE standards* (Bio-Rad) dan pewarnaan hasilnya dengan *comassie blue stain SDS-PAGE standards* (Bio-Rad).

Plasma seminalis kambing dalam proses *electrophoresis* dengan *native-PAGE* menghasilkan 7 pita berdasarkan urutan berat molekul (BM) ketujuh pita tersebut berturut-turut adalah pita pertama (BM 150,288 kDa), kedua (BM 103,486 kDa), ketiga (BM 76,155 kDa), keempat (BM 53,249 kDa), kelima (BM 35,378 kDa), keenam (BM 14,099 kDa), dan ketujuh (BM 11,492 kDa) (Gambar 1).

### Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Kambing Peranakan Ettawa Hasil Sentrifugasi Setelah Suplementasi dengan Tiga Macam Medium

Menghitung membran plasma utuh spermatozoa dilakukan dengan menggunakan *hypoosmotic swelling (HOS) test*. Spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar sebagai akibat



Gambar 1. Gel hasil analisis dengan Native-PAGE 12 % pada plasma seminalis kambing peranakan ettawa (M: marker, 1, 2, 3, 4 : sampel plasma seminalis).

masih berfungsinya membran dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Spermatozoa yang membrannya rusak ditandai dengan ekor yang lurus, dapat dilihat pada Gambar 2. Rerata persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikroskop fase kontras perbesaran 400 kali, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata MPU spermatozoa kambing peranakan ettawa hasil sentrifugasi setelah suplementasi dengan tiga macam medium.

Medium	Waktu Inkubasi
	45 menit (%)
P0 (BO)	33,23 ± 1,51 c
P1 (BO + IGF-I) Complex	37,40 ± 2,78 b
P2 (IGF-I) Complex	60,15 ± 1,77 a

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

**Kadar MDA Spermatozoa Kambing Peranakan Ettawa Hasil Sentrifugasi Setelah Suplementasi dengan Tiga Macam Medium Sebagai Perlakuan**

Menghitung kadar MDA pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode TBA yang dikembangkan oleh Alvarez dan Storey (1995). MDA merupakan salah satu golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi asam lemak poli tak jenuh yang mempunyai lebih ikatan rangkap seperti asam linoleat, asam arakhidonat, dan *decoxa*hexanoid acid (DHA) membran. Peningkatan kadar MDA dalam suspensi lazim digunakan sebagai salah satu indikator untuk peroksidasi lipid membran (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Kadar MDA pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa pada medium yang berbeda menghasilkan pola perbedaan yang nyata pada MPU spermatozoa. Pengamatan dalam medium BO menghasilkan persentase MPU spermatozoa yang paling rendah yaitu 33,23±1,51%. Sedangkan dalam medium *IGF-I complex* menghasilkan persentase MPU yang paling tinggi yaitu 60,15±1,77%. Kombinasi antara medium BO dan *IGF-I*

Tabel 2. Rerata kadar *malondialdehid* (MDA) dalam suspensi spermatozoa kambing peranakan ettawa setelah suplementasi dengan tiga macam medium

Medium	Waktu Inkubasi
	45 Menit (ppm)
P0 (BO)	2316,3241 ± 52,3721 <sup>c</sup>
P1 (BO + IGF- I) Complex	1534,4214 ± 32,3867 <sup>b</sup>
P2 (IGF – I) Complex	1070,1137 ± 8,1107 <sup>a</sup>

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0,05)  
 Keterangan : BO=Bracket and Oliphant’s; IGF-I Complex : Insulin Like Growth Factor–I Complex

*complex* menghasilkan persentase MPU 37,40±2,78%. Uji sidik ragam terhadap MPU spermatozoa, ditemukan adanya perbedaan yang nyata (p<0,05) antara medium BO, kombinasi medium BO+*IGF-I complex* dan medium *IGF-I complex*. Uji jarak berganda duncan pengamatan pada medium *IGF-I Complex* menghasilkan persentase MPU spermatozoa yang paling tinggi.

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada medium yang berbeda menghasilkan pola perbedaan kadar MDA yang nyata dalam suspensi spermatozoa yang berbeda. Pengamatan dalam medium BO menghasilkan

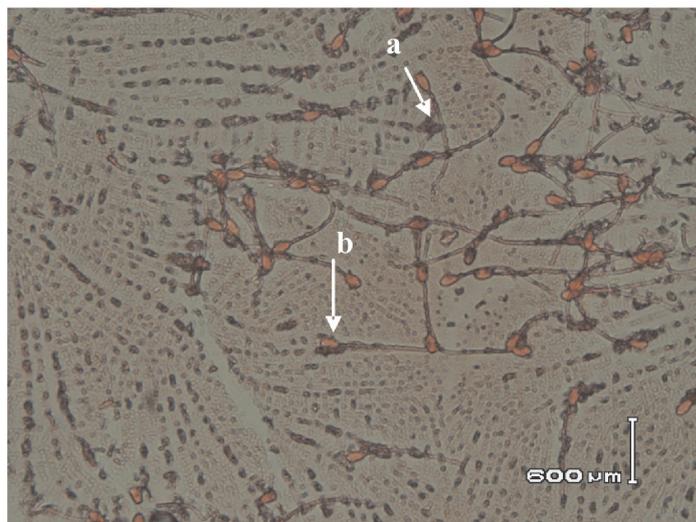
kadar MDA dalam suspensi spermatozoa yang paling tinggi yaitu 2316,3241±52,3721 ppm. Dalam medium *IGF-I Complex* menghasilkan kadar MDA dalam suspensi spermatozoa yang paling rendah yaitu 1070,1137±8,1107 ppm. Kombinasi antara medium BO dan *IGF-I Complex* menghasilkan kadar MDA dalam suspensi spermatozoa yaitu 1534,4214±32,3867 ppm. Uji sidik ragam terhadap kadar MDA dalam suspensi sperma-tozoa terdapat perbedaan yang nyata (p<0,05) antara medium BO, kombinasi medium BO+*IGF-I Complex*, dan medium *IGF-I Com-plex*. Uji jarak berganda duncan pengamatan pada medium *IGF-I Complex* menghasilkan kadar MDA dalam suspensi spermatozoa yang paling rendah.

**Korelasi Antara Kadar MDA dengan Persentase MPU.**

Untuk mengetahui adanya korelasi antar parameter dilakukan uji regresi. Uji regresi menunjukkan korelasi negatif antara kadar MDA dalam suspensi spermatozoa dengan persentase MPU spermatozoa.

**Membran Plasma Utuh**

Keutuhan integritas membran spermatozoa terutama membran plasma mutlak diperlukan untuk menjamin kelangsungan hidup dan keberhasilannya dalam membuahi sel telur. Hal tersebut selain berfungsi melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik, membran plasma juga berperan penting sebagai filter yang



Gambar 2. Spermatozoa setelah mengalami *hipoosmotic swelling test*. a : Spermatozoa yang membran plasmanya utuh (ekornya melingkar), b : Spermatozoa yang membran plasmanya rusak (ekornya lurus)

baik bagi pertukaran zat-zat intra dan ekstraseluler yang dipertahankan dalam proses metabolisme (Garner dan Hafez, 2000). Proses sentrifugasi dapat menginduksi kerusakan integritas membran plasma spermatozoa. Kerusakan integritas membran inilah yang menjadi penyebab modulator pembentukan ROS oleh spermatozoa. ROS merupakan oksidan yang kuat. Walau pun kekuatannya berbeda-beda dan reaktifitasnya dapat merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel (Suryohudoyo, 2000). ROS dapat merusak sel atau molekul yang ada di sekitarnya dengan cara mengoksidasi atau mereduksi elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya (Halliwell dan Gutteridge, 1999) dan terbukti ROS 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). Dalam konsentrasi rendah ROS berperan penting sebagai mediator pada fungsi spermatozoa normal dan terlibat dalam hiperaktivasi, kapasitas, reaksi akrosom, serta fusi spermatozoa dengan sel telur (Lamirande *et al.*, 1997). Namun bila kenaikan konsentrasi ROS di atas nilai normal dan tidak mampu dinetralisis oleh antioksidan yang ada pada spermatozoa, dapat menyebabkan peroksidasi lipid (Alvarez dan Storey, 1995). Akibat akhir dari reaksi berantai ini adalah terputusnya rantai asam-asam lemak menjadi berbagai senyawa aldehyd seperti MDA, 9 hidroksinonemal serta bermacam-macam hidrokarbon, dan etana yang dapat merusak membran sel (Halliwell dan Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000). Rusaknya membran sel akan meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga bahan-bahan yang semestinya tidak boleh melewati membran sel dapat secara bebas ke luar masuk sel dan akhirnya integritas sel spermatozoa terganggu (Agarwal *et al.*, 2003).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dalam kemampuan mempertahankan membran plasma utuh, paling tinggi terlihat pada suplementasi dengan medium *IGF-I Complex*. Sesuai dengan pendapat Donald's (1998), *IGF-I Complex* kemungkinan bertindak sebagai antioksidan, tetapi apakah dengan jalan mencegah terhimpunnya senyawa-senyawa oksidan secara berlebihan (*preventive antioxidants*) ataukah mencegah reaksi rantai berlanjut (*chain-breaking anti-oxidants*) belum

jelas. *Insulin like growth factor-I complex* yang merupakan protein kemungkinan dapat mencegah reaksi Fenton sehingga radikal hidroksil tidak terjadi atau *IGF-I Complex* dapat berikatan dengan radikal bebas sehingga membran sel tetap stabil. Sedangkan pada medium BO mau pun kombinasi medium BO dan *IGF-I Complex*, persentase MPU lebih rendah, hal tersebut kemungkinan adanya ion  $Ca^{2+}$  yang relatif tinggi konsentrasinya khususnya untuk spermatozoa kambing karena  $Ca^{2+}$  mempengaruhi membran.

### Malondialdehyd

Spermatozoa yang mengalami sentrifugasi akan mengalami kerusakan integritas membran spermatozoa (Susilowati, 2000). Di samping itu pembentukan senyawa ROS oleh spermatozoa juga meningkat (Iwazaki dan Gagnon, 1992). ROS terbukti dapat menyebabkan disfungsi sel (Agarwal *et al.*, 2003). Bila salah satu bentuk ROS yaitu radikal hidroksil bereaksi dengan DHA akan terjadi reaksi berantai yang disebut dengan peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi berantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa aldehyd yaitu malondialdehyd (Alvarez and Storey, 1995).

Penelitian Huszar dan Vigue (1994) menemukan adanya peningkatan kadar MDA spermatozoa manusia secara 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. Hal ini sesuai pernyataan yang dilaporkan oleh Alvarez *et al.*, (1987) bahwa makin tinggi tingkat peroksidasi lipid yang terjadi sebagaimana diukur dengan peningkatan kadar MDA. Dengan demikian dapat diprediksikan bahwa makin tinggi tingkat peroksidasi lipid yang terjadi akan makin banyak rantai asam lemak yang putus menjadi senyawa aldehyd sehingga akan lebih banyak kandungan MDA yang terbentuk.

Pada penelitian ini ternyata kadar MDA dalam suspensi spermatozoa hasil sentrifugasi yang disuplementasi dengan *IGF-I Complex* kadarnya paling rendah jika dibandingkan dengan suplementasi medium BO dan kombinasi medium BO+*IGF-I Complex*. Hal ini karena sesuai dengan pendapat Donald *et al.*, (1998) yang menyatakan bahwa *IGF-I Complex*

bertindak sebagai antioksidan. Menurut Suryohudoyo (2000) antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan termasuk enzim dan protein pengikat logam. *IGF-I Complex* kemungkinan sebagai antioksidan pemutus rantai (*chain-breaking antioxidant*). Antioksidan tersebut berfungsi meredam dampak negatif dari senyawa oksigen reaktif dengan cara mencegah reaksi rantai. Antioksidan tersebut mungkin juga sebagai antioksidan pencegah (*preventive antioxidants*), mencegah pembentukan radikal bebas baru, dengan cara mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang mempunyai kesempatan bereaksi, atau dengan mencegah pembentukan radikal bebas baru dari molekul lain. Sampai saat ini belum diketahui dengan jelas apakah *IGF-I Complex* bertindak sebagai antioksidan pemutus rantai atau sebagai antioksidan pencegah.

#### **Korelasi Antara Kadar MDA dengan MPU.**

Pada penelitian ini terdapat korelasi negatif antara kadar MDA dengan membran MPU spermatozoa hasil sentrifugasi setelah suplementasi dengan *IGF-I Complex* protein. Hal tersebut karena pada proses sentrifugasi terjadi kerusakan mekanik pada membran spermatozoa dan terpisahnya plasma seminalis. Akibat pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi adalah adanya peningkatan pembentukan ROS oleh spermatozoa. Modulator pembentukan ROS oleh spermatozoa di antaranya adalah kerusakan mekanik pada membran dan terpisahnya plasma seminalis (Iwazaki dan Gagnon, 1992). ROS dalam konsentrasi normal diperlukan sebagai mediator penting terhadap fungsi spermatozoa, namun bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralkan oleh sistem pertahanan, antioksidan yang ada pada spermatozoa atau plasma seminalis dapat menyebabkan kerusakan asam lemak khususnya asam lemak poli tak jenuh. Asam lemak poli tak jenuh adalah komponen penting dari fosfolipid penyusun membran spermatozoa sehingga akan menyebabkan inaktivasi enzim-enzim glikolitik, gangguan fungsi reseptor, dan transportasi oleh protein. Asam lemak poli tak jenuh tersebut penting untuk mempertahankan fluiditas membran plasma yang dibutuhkan untuk memelihara fungsi-fungsi biokimia dan biologis. Membran plasma merupakan pintu keluar masuk zat-zat

dari dalam sel keluar atau sebaliknya. Selain itu reseptor beberapa zat, utamanya hormon yang tergolong ke dalam protein atau asam amino, juga terdapat beberapa sinyal kimiawi dari ekstraseluler, baik melalui pergerakan aktif maupun pasif. Apabila membran plasma rusak maka proses metabolisme akan terganggu, sintesa ATP tidak berjalan dengan normal yang akan mengakibatkan fatal bagi spermatozoa yaitu menurunnya motilitas mau pun daya tahan hidup.

Ada korelasi negatif antara kadar MDA dengan MPU spermatozoa. ROS secara umum terlibat dalam berbagai proses biologis sel, sebagian besar berasal dari hasil metabolisme normal oksigen, suatu senyawa yang diperlukan oleh semua sel hidup 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 univalent menjadi ROS (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Semakin tinggi kadar MDA yang terbentuk, persentase MPU spermatozoa semakin menurun. MDA merupakan salah satu golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi asam lemak poli tak jenuh, sebagai konsekuensi dari peningkatan konsentrasi senyawa oksigen reaktif dalam sel (Aitken, 1994). Jika asam lemak poli tak jenuh bereaksi dengan radikal hidroksil akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Senyawa MDA merupakan zat yang toksik terhadap sel dan menyebabkan membran kehilangan integritasnya (Griveau dan Le Lannou, 1997). Makin tinggi kadar MDA dalam suspensi spermatozoa akan menyebabkan semakin cepat terjadinya kerusakan membran sel. Pada membran sel, ROS mengadakan sejumlah reaksi rantai dengan asam lemak khususnya asam lemak poli tak jenuh yang dikenal sebagai peroksidasi lipid. Semakin lama waktu inkubasi, ROS yang terbentuk semakin reaktif, dan banyaknya ROS yang terbentuk tidak mampu dinetralkan oleh antioksidan, akibatnya tingkat kerusakan membran sel semakin tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian Tjokronegoro dan Mohamad (2002) yang melaporkan bahwa stres oksidatif mempunyai hubungan dengan motilitas, morfologi, daya tahan hidup, kemampuan kapasitas, dan bertambahnya kerusakan membran.

## SIMPULAN

Penambahan protein *Insulin Like Growth Factor –I Komplek* plasma seminalis kambing dalam suspensi spermatozoa hasil sentrifugasi dapat menurunkan kadar malondialdehid dan meningkatkan persentase membran plasma utuh spermatozoa. Makin tinggi kadar malondialdehid yang terbentuk makin rendah persentase membran plasma utuh

## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Saleh RA, Bedalwy MA., 2003. Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertil Steril*.79:829-843.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishert. 1998. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxydation and Human sperm Function. *Biol Reprod* 40 : 183-197.
- Aitken RJ. 1994. A Free Radical Theory of Male Infertility. *Reprod Fertil Dev*. 6 : 19-24.
- Alvarez JG, Storey BT. 1995. Differential incorporation of Fatty acid into and peroxidative loss of fatty acid from phospholipid of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42:334-345.
- Aulani'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Malang: Citra Mentari Group. 53-85.
- Barreca A, Ponzani P, Arvigo M, Giordano G, Minuto F. 1995. Effect of The Acid Labile Subunit on the Binding of Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein 3 to (125 I ) IGF-I. *J.Clin Endocrinol Metab* 80(4): 1318-1324.
- Baxter RC. 1990. Circulating Levels and Molecular Distribution of The Acid labile (Alpha) Subunit of The High Molecular Weight Insulin Like Growth Factor Binding Protein Complex. *Australia J Clin Endocrinol Metab* 70(5).
- Donald MH, Kouba JA, Lackey BR, William R., Gray B, Gray SL. 1998. Identification of Insulin Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa. *Influence on Sperm Motility* 59 : 330-337.
- Donald'S Mc, 2003. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Fifth Edition. Edited by: Pineda MH, Dooley MP. Pp 154-225, 265, 325,447.
- Dorota S, Kurpisz M. 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *Reprod Biol and Endocrinol* 1-7.
- Garner, Hafez ESE, 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Philadelphia.
- Griveau JP LeLannou D. 1997. Reactive Oxygen Speciec and Human Spermatozoa. Physiology and Pathology. *Int J Androl* 20: 60-90.
- Guzman EG; Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG; Thomas J, Agarwal A. 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16(9) :1922-1930.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford : Oxford University Press. Pp: 1-35, 246-350, 664-667.
- Iwazaki A, Gagnon C, 1992. Formation of Reactive Oxygen Species in Spermatozoa of Infertile Patient. *Fertil Steril* 57 : 408-416.
- Lamirande EH, Jiang A , Kodana H, Gagnon C, 1997. Reactive oxygen Speciec and Sperm Physiol Rev Reprod 2(1):48-54.
- Macpherson ML, Simmen RCM, Simmen FA, Hernandez J; Sheerin BR, Varner DD; Loomis P, Cadario ME, Miller CD, Brinsko SP, Rigby S and, Blanchard TL. 2002. Insulin Like Growth factor I and Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2 and 5 Equine Seminal Plasma : Association with Sperm Characteristics and Fertility. *Biol Repro* 67: 648-654.
- Roser JF, Hess MF.2001. The Effect of Age and Fertility Status on Plasma and Intra-testicular insulin Like Growth Factor I Concentration in Stallion. *Theriogenology* 56: 723-733.
- Suryohudoyo P. 2000. Ilmu Kedokteran Molekuler. Cetakan Pertama. Jakarta : CV Sagung Seto. Pp 31-47.
- Susilawati T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. *Disertasi Surabaya: Universitas Airlangga*: 15-20.
- Tjokronegoro A, Mohamad SD.2002. Oxidative Strees and Male Infertility Pathophysiology and Clinical Implication. *Jurnal Kedokteran Yarsi* 10 (1): 50-59.