

HUBUNGAN MOTILITAS DAN VITALITAS SPERMATOZOA DENGAN KADAR REACTIVE OXYGEN SPECIES PADA INKUBASI SPERMATOZOA MANUSIA DENGAN GRANULOSIT SECARA IN VITRO

Sukarjati

Prodi Biologi, FMIPA Universitas PGRI Adi Buana Surabaya

ABSTRAK

Infeksi traktus genitalis pria dapat menyebabkan infiltrasi leukosit ke saluran reproduksi pria dengan akibat terjadinya penurunan motilitas dan vitalitas sperma. Leukosit yang mengkontaminasi semen dapat secara potensial merusak spermatozoa melalui substansi toksik seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berkaitan dengan fagositosis. Produksi ROS yang tinggi berhubungan dengan gangguan fertilitas pria sebab ROS dapat menyebabkan peroksidasi membran plasma spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan hubungan motilitas dan vitalitas sperma dengan kadar *Reactive oxygen species* (ROS) pada inkubasi sperma dengan granulosit secara in vitro.

Sampel penelitian ini spermatozoa normal menurut kriteria WHO (1999) yang diperoleh dari 16 pria donor. Sperma dipreparasi menggunakan sil select plus. Granulosit diperoleh dari darah donor yang diisolasi menggunakan Histopaque 1077 dan 1119. Dilakukan inkubasi sperma dengan granulosit selama 3 jam. Pengamatan motilitas dan vitalitas menggunakan mikroskop. Pada pengamatan ROS, dilakukan stimulasi dengan peroksidase dan PMA. Pengukuran kadar ROS dilakukan dengan metode khemiluminence menggunakan alat beta counter. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan korelasi Pearson. Hasil penelitian ini adalah, pada sperma: ada hubungan berbanding terbalik antara motilitas sperma kategori a+b dengan kadar ROS sperma baik yang distimulasi peroksidase ($r = - 0,884$, $p = 0,000$) maupun yang distimulasi dengan PMA ($r = - 0,964$, $p = 0,000$). Vitalitas sperma dengan ROS sperma yang distimulasi peroksidase ada hubungan berbanding terbalik ($r = - 0,826$, $p = 0,000$), demikian juga dengan yang distimulasi PMA ($r = - 0,916$, $p = 0,000$). Pada inkubasi sperma dengan granulosit juga ada hubungan berbanding terbalik antara motilitas sperma kategori a+b dengan kadar ROS sperma yang diinkubasi dengan granulosit baik yang distimulasi peroksidase ($r = - 0,827$, $p = 0,000$) maupun yang distimulasi PMA ($r = - 0,768$, $p = 0,000$). Vitalitas sperma pada sperma yang diinkubasi dengan granulosit juga ada hubungan berbanding terbalik dengan ROS sperma yang diinkubasi dengan granulosit, baik yang distimulasi peroksidase ($r = - 0,954$, $p = 0,000$) maupun yang distimulasi PMA ($r = - 0,874$, $p = 0,000$).

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan Kadar ROS yang tinggi pada inkubasi sperma dengan granulosit akibat terjadinya *respiratory burst* yang mengakibatkan terjadinya penurunan motilitas dan vitalitas sperma.

Kata Kunci: *Spermatozoa, Motilitas, vitalitas, ROS, Granulosit*

PENDAHULUAN

Disfungsi Spermatozoa adalah penyebab paling penting dari infertilitas. Motilitas sperma merupakan salah satu penentu dalam suksesnya fertilisasi baik secara in vitro maupun in vivo (Bonde et

al., 1998). Beberapa studi telah menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa paling penting bagi fertilitas pria (Karpuz et al., 2007). Hubungan penurunan motilitas dengan waktu adalah fenomena universal. Penurunan motilitas tersebut berbeda

antara spesies yang satu dengan lainnya dan di antara individu-individu dari spesies yang sama, seperti halnya pada pria. Mayoritas spermatozoa berhenti bergerak dalam waktu 24 jam pertama. Kelangsungan hidup spermatozoa setelah ejakulasi tergantung pada kondisi lingkungan di mana spermatozoa tersebut disimpan. Dalam saluran reproduksi wanita sperma tetap aktif selama beberapa hari. Tetapi lama aktivitas spermatozoa jauh lebih singkat jika sperma berada dalam cairan semen di luar tubuh. Infeksi saluran reproduksi pria adalah penyebab relevan infertilitas karena kelainan pada kualitas sperma mempengaruhi jumlah dan motilitas spermatozoa (Golshani et al, 2006) Perbandingan karakteristik semen antara pria yang terinfeksi dan tidak terinfeksi menunjukkan bahwa motilitas dan viabilitas sperma lebih rendah ketika mikroorganisme ada dalam semen (Menkveld et al., 2001). Bakteri memiliki efek langsung pada kualitas semen dengan akibat negatif pada fertilitas. Hal ini dapat terjadi pada pria yang memiliki infeksi saluran reproduksi, termasuk infeksi pada prostat (prostatitis), epididymus (epididimitis), atau testis (orchitis). Infeksi tersebut bersifat asimtomatik. Indikator bahwa telah terjadi infeksi traktus genitalis adalah adanya bakteri saat dilakukan kultur semen (bakteriospermia) dan ditemukannya lekosit dengan jumlah lebih dari 1 juta/ml semen (lekositospermia) (Fraczek et al., 2004). Konsentrasi bakteri $\geq 10^3$ colony forming unit (cfu)/ml pathogen traktus urinarius di dalam ejakulat ditetapkan sebagai bakteriospermia (Weidner et al., 1999).

Escherichia coli (*E. coli*) adalah salah satu mikroorganisme yang paling sering diisolasi dari ejakulat (Huerta et al., 2002). *E. coli* merupakan penyebab utama

prostatitis dan epididimitis. *E. coli* menyebabkan terjadinya aglutinasi dan imobilisasi sperma (Huwe et al, 1998;. Khalili & Sharifi-Yazdi, 2001). Diemer et al. (1996) melaporkan bahwa *E. coli* menghambat motilitas sperma dengan perlekatan langsung dan menyebabkan aglutinasi. Kecepatan dan tingkat aglutinasi sperma-*E.coli* menunjukkan perlekatan yang kuat.

Infeksi pada saluran reproduksi pria dapat merusak *blood testis barrier* yang mengakibatkan terjadinya infiltrasi lekosit ke saluran reproduksi. Insiden lekositospermia berkisar 10 – 20 % pada pria infertil, dan *Polymorphonuclear neutrophil* (PMN) serta makrofag adalah komponen utama lekosit seminal plasma (Agarwal et al., 2003). Lekosit yang mengkontaminasi semen dapat secara potensial merusak spermatozoa melalui substansi toksik seperti ROS yang berkaitan dengan fagositosis. Lekosit telah diidentifikasi menjadi penghasil utama ROS dalam semen dan sebagai sumber penting kerusakan oksidatif ke spermatozoa yang mana merupakan faktor kunci sebagai penyebab infertilitas pria (Fraczek et al., 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan motilitas dan vitalitas spermatozoa dengan kadar ROS pada inkubasi sperma-granulosit.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Spermatozoa, granulosit, sil select plus, Histopaque 1077 dan 1119 (*Sigma Aldrich*).

METODE

Preparasi spermatozoa

Spermatozoa berasal dari ejakulat pria yang mempunyai spermatozoa normal

menurut kriteria WHO (1999). Semen diperoleh dengan cara masturbasi dan ditampung ke dalam botol kaca atau plastik steril yang bermulut lebar setelah abstinencia sedikitnya 2 hari dan tidak lebih lama dari 7 hari. Setelah liquifaksi dilakukan analisa spermatozoa menurut kriteria WHO (1999). Kriteria spermatozoa normal menurut WHO (1999) adalah: Volume: 2 ml atau lebih, pH: 7.2 -7.8, Konsentrasi sperma: 20 juta spermatozoa/ml atau lebih. Total jumlah sperma: 40 juta sperma / ejakulat atau lebih, Motilitas : 50% atau lebih kategori a+b atau 25 % atau lebih kategori a, Morfologi : 15 % atau lebih mempunyai morfologi normal, Vitalitas: 75 % atau lebih hidup. Sel darah putih: kurang dari 1 juta/ml. Selanjutnya dilakukan preparasi spermatozoa menggunakan metode kolom bertingkat Percoll (Sil Select Plus).

Spermatozoa hasil preparasi dengan metode kolom bertingkat Percoll tersebut dilakukan penghitungan konsentrasi menggunakan *Haemocytometer Neuber*, dilakukan pengamatan terhadap motilitas dan vitalitas pada siapan basah

Pengamatan motilitas

Spermatozoa diambil satu tetes diletakkan pada *object glass* lalu ditutup *cover glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Motilitas ditentukan dengan kategori menurut WHO (1999) yaitu a. gerakan cepat maju lurus ke depan. b. gerakan lambat ke depan c. tidak bergerak maju atau bergerak di tempat d. tidak bergerak. Dilakukan penghitungan pada 100 spermatozoa.

Pengamatan vitalitas

Spermatozoa diambil satu tetes diletakkan pada *object glass*, ditetesi satu

tetes Eosin Y dan dicampur. Pengamatan dilakukan setelah 30 detik dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 x. Spermatozoa hidup tidak tercat dan sperma mati tercat merah. Dihitung pada 100 spermatozoa.

Isolasi granulosit

Granulosit disiapkan menggunakan Histopaque 1077 dan 1119 (*Sigma Aldrich*). Granulosit yang telah diisolasi dihitung konsentrasinya menggunakan *Haemocytometer Neuber*, dan diamati viabilitas selnya.

Inkubasi spermatozoa dengan granulosit.

Spermatozoa hasil Percoll dibagi 2 bagian, selanjutnya diperlakukan sebagai berikut :

- A. Spermatozoa tanpa granulosit (Kontrol)
- B. Spermatozoa di inkubasi dengan granulosit

Inkubasi dilakukan di *microtube eppendorf* selama 3 jam. Selanjutnya diamati motilitas, vitalitas spermatozoa serta kadar ROS.

Pengamatan motilitas dan vitalitas

Prosedur pengamatan motilitas dan vitalitas sama seperti pengamatan motilitas dan vitalitas sebelum perlakuan

Penentuan Kadar ROS

Pada A (Spermatozoa tanpa granulosit (Kontrol) dibagi 2 bagian, pada B (Spermatozoa di inkubasi dengan granulosit) dibagi 2 bagian, pada masing masing bagian dilakukan pengamatan terhadap kadar ROS dengan perlakuan sebagai berikut :

A1 dan B1 : distimulasi dengan Peroksidase

A2 dan B2 : distimulasi dengan PMA

Prosedur pengamatan A1 dan B1 adalah sperma yang akan diperiksa (0,4 ml) ditambah 8,5 µl luminol (25 mM dalam DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) dengan konsentrasi akhir 250 µM), 12 µl *horseradish peroxide* (2mg/ml PBS) dan 29,5 media Earle's (Sudjarwo, 2001). Diamati khemiluminisen pada 1,3 dan 5 menit. Analisis dilakukan pada rata rata ROS pada pengamatan 1,3 dan 5 menit.

Prosedur pengamatan A2 dan B2 adalah sperma yang akan diperiksa (0,4 ml) ditambah 8,5 µl luminol (25 mM dalam DMSO, (*Dimethyl Sulfoxide*) dengan konsentrasi akhir 250 µM), 12 µl *horseradish peroxide* (2mg/ml PBS) dan 3 µl PMA (larutan phorbol-12-miristat-13-asetat) 1mM dalam DMSO) dan 27 media Earle's. Dilakukan pengamatan pada 1, 3, dan 5 menit. Analisis dilakukan pada rata hasil pengamatan 1, 3, dan 5 menit.

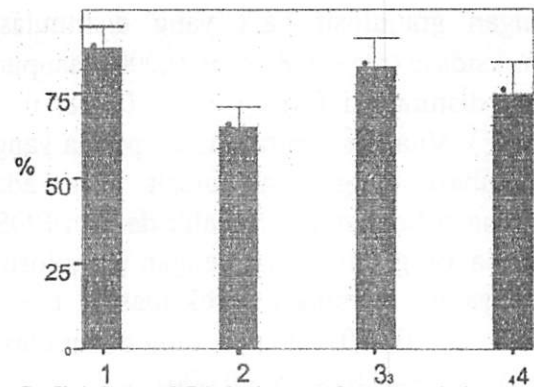
Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan korelasi Pearson dengan bantuan SPSS 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

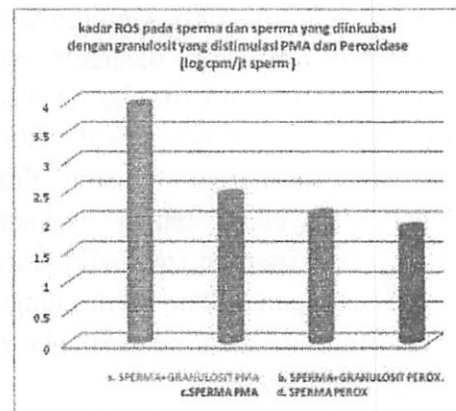
Hasil

Penelitian ini telah memperoleh data motilitas dan vitalitas spermatozoa baik pada sperma maupun sperma yang diinkubasi dengan granulosit. Adapun data tersebut disajikan pada grafik 1. Disamping itu juga diperoleh data tentang kadar ROS sperma, kadar ROS sperma yang diinkubasi dengan granulosit baik yang distimulasi PMA maupun yang distimulasi dengan Peroxidase. Data kadar ROS disajikan pada grafik 2.



Grafik 1. Pengaruh Inkubasi sperma dengan granulosit selama 3 jam terhadap kualitas sperma

Keterangan : 1. Mot sperm 2. Mot sperm + granulosit
3. Vit sperm 4. vit sperm + granulosit



Grafik2: Kadar ROS

Hasil Analisis Data

Pada sperma, ada hubungan berbanding terbalik antara motilitas sperma kategori a+b dengan kadar ROS sperma baik yang distimulasi peroksidase ($r = -0,884$, $p = 0,000$) maupun yang distimulasi dengan PMA ($r = -0,964$, $p = 0,000$). Vitalitas sperma dengan ROS sperma yang distimulasi peroksidase ada hubungan berbanding terbalik ($r = -0,826$, $p = 0,000$), demikian juga dengan yang distimulasi PMA ($r = -0,916$, $p = 0,000$). Pada inkubasi sperma dengan granulosit juga ada hubungan berbanding terbalik antara motilitas sperma kategori a+b dengan kadar ROS sperma yang diinkubasi

dengan granulosit baik yang distimulasi peroksidase ($r = -0,827$, $p = 0,000$) maupun yang distimulasi PMA ($r = -0,768$, $p = 0,000$). Vitalitas sperma pada sperma yang diinkubasi dengan granulosit juga ada hubungan berbanding terbalik dengan ROS sperma yang diinkubasi dengan granulosit, baik yang distimulasi peroksidase ($r = -0,954$, $p = 0,000$) maupun yang distimulasi PMA ($r = -0,874$, $p = 0,000$).

Pembahasan

ROS mempunyai sifat sebagai oksidator. Spermatozoa merupakan sel yang amat peka terhadap oksidasi. Umumnya sel dilindungi dari kerusakan oksidatif oleh adanya antioksidan dalam sitoplasma. Pada spermatozoa, sitoplasmanya sangat sedikit ($20 \mu\text{m}^3$) dan sitoplasma tersebut tidak terdistribusi menyebar tetapi terlokasi dalam *mid piece* spermatozoa. Akibatnya spermatozoa mengandalkan perlindungan antioksidan yang ada pada seminal plasma (Ochsendorf *et al.*, 1998).

ROS yang paling umum yang memiliki implikasi potensial dalam biologi reproduksi adalah anion superoksida ($\text{O}_2 \cdot^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal peroksil dan radikal hidroksil yang sangat reaktif. Pada sel sperma, sumber ROS secara luas tersebar antara sumber eksternal dan internal. ROS produksi Eksternal terutama $\text{O}_2 \cdot^-$ dan H_2O_2 , didapat dari hasil kontaminasi lekosit dalam semen. Sumber ROS lain yang penting adalah sperma yang belum matang dan spermatozoa yang abnormal secara morfologis. Spermatozoa, tidak seperti sel-sel lain, yang unik dalam struktur, fungsi dan kerentanan terhadap kerusakan oleh lipid peroksidasi.

Pada penelitian ini terdapat hubungan berbanding terbalik antara

motilitas dan vitalitas sperma dengan kadar ROS pada sperma maupun pada sperma yang diinkubasi dengan granulosit. Granulosit dapat mengeluarkan ROS (Wolff, 1995) dan sitokin (Ochsendorf, 1999). Tingginya kadar ROS menurut Puruhit *et al.*, (1999) menyebabkan patologi pada spermatozoa seperti menurunnya ATP dan spermatozoa menjadi kehilangan motilitasnya. Inkubasi spermatozoa dengan ROS pada satu jam pertama telah menurunkan motilitas spermatozoa secara signifikan (de Lamirande dan Gagnon, 1992 b; Baumber *et al.*, 2000). Ruiz-Pesini *et al.*, (1998) menyatakan motilitas spermatozoa tergantung pada energi yang dihasilkan oleh mitokondria. Dilaporkan bahwa gangguan motilitas berhubungan dengan delesi mtDNA yang mengkode kompleks I, III dan IV serta delesi pada nDNA yang mengkode kompleks II.

Ochsendorf, *et al.* (1999), melaporkan motilitas sperma menurun pada spermatozoa hasil Percoll yang ditambah granulosit yang diaktivasi setelah 1 jam. Setelah ditambahkan seminal plasma, terjadi penurunan khemiluminisensi dan mencegah hilangnya motilitas. Plante *et al.* (1994), menyatakan bahwa $0,6 \cdot 10^6$ granulosit yang aktif diperlukan untuk menurunkan motilitas spermatozoa jika seminal plasma tidak ada. Ochsendorf, *et al.* (1999), juga menunjukkan bahwa konsentrasi lekosit dalam *whole semen* antara $1,4 \cdot 10^4$ dan $2,97 \cdot 10^4$ tidak berpengaruh terhadap fungsi sperma. Tetapi jika konsentrasi lekosit tinggi (lebih dari 1 juta/ml) pengaruh perlindungan dari seminal plasma tidak mampu mengatasinya.

Ada beberapa mekanisme yang menjelaskan hubungan penurunan motilitas spermatozoa dengan ROS. Salah satu mekanismenya adalah terjadinya

peroksidasi asam lemak tak jenuh pada lipid membran. (Aitken *et al.*, 1993, Baumber *et al.*, 2000). Pada membran spermatozoa mudah terjadi peroksidasi lipid karena kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi pada membran plasmanya. Akibat dari peroksidasi lipid adalah hilangnya asam lemak tak jenuh yang berhubungan dengan produksi radikal lipid hidroperoksida, radikal alkoksil dan radikal peroksil. Radikal ini mendukung reaksi berantai lipid peroksidasi dan menyebabkan produksi aldehyd sitotoksik seperti malondialdehyd. Tingginya konsentrasi asam lemak tak jenuh diperlukan untuk memberikan fluiditas membran plasma yang diperlukan untuk motilitas. Hilangnya integritas dapat menyebabkan bertambahnya permeabilitas membran dan hilangnya kemampuan untuk mengatur konsentrasi ion intraseluler yang terlibat dalam mengontrol pergerakan spermatozoa.

ROS berpengaruh terhadap motilitas dapat juga melalui mekanisme berubahnya fungsi mitokondria. Potensial membran mitokondria digunakan sebagai ukuran fungsi mitokondria meliputi sintesis ATP, import protein mitokondria, homeostasis calcium dan transport metabolit (Baumber *et al.*, 2000).

Kaitan antara tingginya kadar ROS dan menurunnya motilitas spermatozoa adalah hasil menurunnya fosforilasi protein aksonema dan immobilisasi spermatozoa, yang keduanya berhubungan dengan fluiditas membran. Dinyatakan bahwa H_2O_2 dapat berdifusi melintasi membran masuk ke dalam sel dan menghambat aktivitas beberapa enzim seperti Glukose-6-Phospat Dehidrogenase (G_6PD). Pada spermatozoa yang mempunyai residu sitoplasma mempunyai G_6PD yang tinggi sehingga

menghasilkan ROS yang lebih tinggi (Ford, 2004; Aitken, 1997). G_6PD ini mengontrol kecepatan aliran glukosa melalui *hexosa monopospat shunt* yang selanjutnya mengontrol tersedianya NADPH intraseluler yang digunakan sebagai sumber elektron oleh spermatozoa untuk pembakaran yang menghasilkan ROS oleh sistem enzim NADPH oksidase. Penghambatan G_6PD mengakibatkan menurunnya NADPH dan secara bersamaan terjadi akumulasi glutation teroksidasi dan glutation tereduksi. Hal ini dapat mengurangi antioksidan (Agarwal *et al.*, 2003). Keadaan tersebut juga sesuai dengan hasil pengamatan Dandekar, *et al.*, (2002) bahwa pasien asthenospermia tingkat SOD dan glutation peroksidase turun.

Kadar ROS yang distimulasi PMA lebih tinggi dari pada kadar ROS yang distimulasi Peroksidase baik pada spermatozoa, spermatozoa yang diinkubasi dengan granulosit.

PMA diketahui menginduksi produksi ROS melalui perantara mekanisme protein kinase C (PKC) (Gil-Guzman *et al.*, 2001). Armstrong *et al.*, (2002) telah melakukan penelitian dengan menstimulasi sperma dengan PMA untuk mengaktifasi PKC. Hasil yang diperoleh adalah sperma gagal menghasilkan ROS yang berlebih, dan disimpulkan aktivasi NADPH oksidase pada sperma tidak melibatkan PKC *dependent phosphorilation*. Mekanisme aktivasi NADPH oksidase sperma secara fundamental berbeda dari lekosit oksidase (Armstrong *et al.*, 2002). Aktivasi NADPH oksidase sperma tidak tergantung PKC *dependent phosphorilation* dan disimpulkan ATP tidak digunakan sebagai substrat selama proses aktivasi. Dilaporkan bahwa ATP sel darah putih secara signifikan menurun setelah distimulasi dengan PMA.

ATP spermatozoa tidak menurun dalam ada dan tidak adanya PMA.

Spermatozoa dapat merupakan antigen bagi granulosit. Tingginya kadar ROS pada inkubasi spermatozoa dengan granulosit disebabkan telah terjadi fagositosis pada spermatozoa oleh granulosit. Hal ini menyebabkan terjadinya *oxygen burst* yang menyebabkan dikeluarkannya dalam jumlah besar O_2^- dan H_2O_2 (Fraczek *et al.*, 2004) yang tidak dapat ditangkal oleh sistem perlindungan antioksidan intrasellular dari spermatozoa.

Spermatozoa normal dari manusia tidak dapat merespon stimulasi PMA dengan mempertinggi produksi O_2^- , hanya spermatozoa defek yang dapat merespon PMA. Ketidakmampuan PMA untuk mengaktivasi NADPH oksidase pada spermatozoa bukan karena kurangnya aktivitas protein kinase C (PKC) dalam sel ini (Vernet *et al.*, 2001). Sampai sekarang, faktor yang tampak mampu mengaktifkan kompleks enzim ini dalam spermatozoa adalah substrat dalam bentuk NADPH. Dalam hal ini sperm oksidase tidak seperti enzim lekosit yang harus diaktivasi sebelum ia dapat menghasilkan O_2^- . Kurang diperlukannya aktivasi oksidase mungkin menjelaskan mengapa PMA tidak efektif dalam menstimulasi produksi O_2^- . Perbedaan antara sperma oksidase dan lekosit oksidase berkenaan dengan kebutuhan mereka untuk aktivasi mungkin mencerminkan perbedaan yang fundamental dalam struktur dan fungsi dari tipe sel yang berbeda. Pada lekosit, mekanisme aktivasi ditentukan oleh oksidase pada tingkat untuk memastikan bahwa O_2^- tidak secara konstan dihasilkan oleh lekosit tetapi hanya dihasilkan selama *oxidative burst* ketika fagosit diaktivasi oleh rangsangan yang tepat seperti sel asing

atau organisma. Sebaliknya spermatozoa terus menerus memerlukan dihasilkannya ROS dalam tingkat untuk menstimulasi signal transduksi *redox-regulated* untuk kapasitas. Selain itu kurangnya sitoplasma dalam spermatozoa dan memerlukan persaingan NADPH sitoplasma untuk pembakaran *glutation cycle* dimaksudkan bahwa dibawah kondisi normal, oksidase hanya akan berjalan pada substrat yang cukup untuk memelihara aktivitas tingkat rendah yang konstan yang diperlukan untuk mendukung kapasitas. Jika ruang sitoplasma bertambah, yang dikarakteristikan pada sperma dengan sisa sitoplasma (*sitoplasmic droplet*), substrat yang tersedia berlimpah dan O_2^- dihasilkan dalam jumlah besar maka dapat menginduksi kerusakan peroksidatif (Vernet *et al.*, 2001). Uraian tersebut diatas dapat menjelaskan bahwa pada penelitian ini inkubasi spermatozoa dengan granulosit mempunyai kadar ROS yang lebih tinggi dari pada granulosit dan sperma.

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan Kadar ROS yang tinggi pada inkubasi sperma dengan granulosit akibat terjadinya *respiratory burst* akibat terjadinya fagositosis. Kadar ROS yang tinggi akan menurunkan motilitas dan vitalitas sperma

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A., Saleh RA., Bedaiwy MA., 2003, *Role of Reactive Oxygen Species in The pathophysiology of Human Reproduction*, Fertil Steril , 79: 829-843
- Aitken RJ., 1993., *Analysis of Lipid Peroxidation Mechanism in Human Spermatozoa*, Molecular Reproduction and Development, 35:302-315.

- Aitken, R.J., 1997, *Molecular mechanisms regulating human sperm function*, *Molecular Human Reproduction*, 3(3): 169-173.
- Armstrong, J.S., Bivalacqua, T.J., Chamulitrat, W., Sikka, S., Hellstrom WJG., 2002, *A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells*, *Int. J. of Andrology*, 25:223-229
- Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina V., Davies-Morel, MCG., 2000, *The effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane potential, and membrane lipid Peroxidation*, *J. androl*, 21: 895-902
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J & Skakkebaek NE, 1998, *Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners*. *Lancet* 352: 1172-1177
- Dandekar SP., Nadkarni GD., Kulkarni VS., Punekar S., 2002, *lipid peroxidation and enzymes in male infertility*, *J. Postgrad Med*, 48(3) : 186-189.
- de Lamirande, E., and Gagnon, C., 1992 a, *Reactive oxygen species (ROS) and human spermatozoa, I: effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes*, *J. Androl.*, 13,368-378.
- Diemer T., Weidner W., Michelmann HW., Schiver HG., Rovani E., and Mayer F., 1996, *Influence of E. coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro*, *Int. J. of Andrology*, 19 : 271-277.
- Ford, W.C.L., 2004, *Regulation of sperm function by reactive oxygen species*, *Human Reproduction Update*, 10(5): 387-399.
- Fraczek M., Sanocka D., and Kurpisz M., 2004 , *Interaction between Leucocytes and Human Spermatozoa Influencing Reactive Oxygen Intermediates Release*, *Int. J. of Andrology*, 27:69-75.
- Gil-Guzman, E , Ollero, Lopez, Sharma RK., Alvarez, Thomas Jr., agarwal, A., 2001, *Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation*, *Human Reproduction*, 16 (9): 1922-1930.
- Golshani M, Taheri S, Eslami G, Suleimani Rehber AA, Fallah F & Goudarzi H, 2006, *Genital tract infection in asymptomatic* *Am. J. Biomed. Sci.*, 1(2): 126-132.
- Huerta M, Cervera AR, Hernandez I & Ayala AR., 2002, *Frequency and etiology of seminal infections in the study of infertile couples*, *Ginecol Obstet Mex*, 70: 90-94.
- Huwe P , Diemer T., Ludwig M., Liu J., Schiefer HG., Weidner W, 1998, *Influence of different urophatogenic microorganism on human sperm motility parameters in an in vitro experiment*, *Andrologia*, 30 (1) : 55- 59
- Karpuz V, Gokturk A & Meral Koyuturk M., 2007, *The effects of sperm morphology and motility on the outcome of intracytoplasmic sperm injection*, *Marmara Med J* 20: 92-97.
- Khalili MB & Sharifi-Yazdi MK., 2001, *The effect of bacterial infection on the*

- quality of human's spermatozoa. Iranian J Publ Health* 30: 119-122.
- Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AMM, Thomas CMJ, Merkus HMWM & Steegers-Thuenissen RPM., 2001, *Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds.* Hum Reprod 16: 1165-1171.
- Ochsendorf, FR., 1999, *Infections in the male genital tract and reactive oxygen species,* Human Reproduction Update, 5(5):399-420.
- Ochsendorf,FR., 1998, *Infection and Reactive Oxygen Species,* Andrologia, 30(1): 81-86.
- Plante, M., de Lamirande, E., and Gagnon, C., 1994, *Reactive Oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility,* Fertility and Sterility , 62, 387-393.
- Purohit SB., Laloraya M., Kumar GP., 1999, *Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa,* Asian J. Androl, 1: 95-107
- Ruiz-Pesini, E., Diez C., Lapena AC., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Arenas, J., and Lopez Perez MJ., 1998, *Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities,* Clinical Chemistry, 44(8): 1616-1620.
- Vernet, P., Fulton N., Wallace, C., Aitken, RJ., 2001, *analysis of Reactive oxygen species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa,* Biology of reproduction, 65(4): 1102-1113.
- Weidner, W., Krause, W., and Ludwig, M., 1999, *Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis,* Human Reproduction Update, 5(5): 421-432.
- Wolff, H., 1995, *The Biologic significance of white blood cells in semen,* Fertil Steril, 63 : 1143-1157.
- World Health Organization , 1999, *WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction,* 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.