

Efektivitas Penambahan Vitamin E (*alfa-Tokoferol*) dalam Medium Pencucian Sperma dengan Sentrifugasi terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Brahman

(Effect of vitamin E addition (*alfa-tokoferol*) into sperm washing medium by centrifuge on the quality of Brahman cattle spermatozoa)

Dasrul¹, Rasmaidar², Abdul Harris²

1. Laboratorium Reproduksi FKH Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh
2. Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh

ABSTRAK The aims of study to determine the effectiveness of the addition of vitamin E in the washing medium by centrifugation on sperm quality Brahman cattle. frozen semen of Brahman cattle, divided into 4 treatment groups addition of vitamin E in the washing medium: 0.0gr/100 ml medium (K₀), 0.1gr /100 ml medium (K₁); 0.2gr/100 ml medium (K₂) and 0.3 g / 100 ml medium (K₄), each group was repeated 5 times. Examination of motility, viability and integrity of sperm membrane performed according to WHO standards. The data obtained were analyzed with one-way ANOVA and Duncant test. The average percentage of motility, viability and membrane integrity of spermatozoa in the addition of vitamin E were significantly different (P <0.05) compared to the control.

Percentage of motility, viability and membrane integrity of spermatozoa in the group K₂ significantly higher (P <0.05) compared with the group K₃; K₁ and K₀. Percentage of motility, viability and sperm capacitation and sperm live on group K₃ significantly higher (P <0.05) compared with the K₁ and K₀. While the percentage motility of spermatozoa in the group K₁ higher were not significant (P> 0.05) compared with the group K₀. The addition of vitamin E in the medium on the process of washing spermatozoa Brahman cattle. The addition of vitamin E 0.2gr/100ml better than vitamin E 0.1gr/100ml and 0.3gr/100ml in maintaining the percentage of motility and live spermatozoa Brahman cattle.

Keywords: vitamin E; preparation of sperma, motility, viability and integrity membrne plasma intact

2012 Agripet : Vol (12) No. 2 : 7-13

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini bioteknologi reproduksi Transfer Embrio (TE) menjadi wacana penting untuk mengembangkan dan meningkatkan produktivitas ternak dalam waktu yang relatif singkat. Transfer embrio merupakan teknologi pemindahan embrio yang berasal dari induk donor unggul yang dikawinkan dengan pejantan unggul ke dalam uterus induk betina resipien yang tidak unggul, sehingga induk resipien melahirkan anak 100 % unggul (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Namun demikian dalam pelaksanaannya dilapangan masih banyak ditemukan kendala, satu diantaranya adalah terbatasnya persediaan embrio yang unggul dengan tingkat perkembangan yang seragam. Salah satu usaha untuk pengadaan embrio dalam jumlah yang

banyak, murah dan seragam dapat dilakukan dengan teknologi in vitro fertilisasi.

In vitro fertilisasi dapat di artikan suatu teknik pembuahan yang terjadi di luar tubuh induk, dengan cara mempertemukan sel telur yang matang dengan sel spermatozoa yang telah berkapasitasi dalam cawan yang berisi medium kultur (Sukra, *dkk.* 1992). Khusus pada spermatozoa sebelum difertilisasikan terlebih dahulu harus mengalami pencucian untuk memisahkan spermatozoa motil dangan immotil dan zat-zat toksik lainnya, sehingga dapat meningkatkan daya fertilitasnya (Agarwal *et al.*, 2004).

Sentrifugasi merupakan salah satu metode pencucian spermatozoa yang di lakukan dengan cara memutar sperma di dalam tabung yang berisi medium isotonis dengan waktu dan kecepatan tertentu (Hafez, 2000; Agarwal *et al.*, 2004). Telah terbukti bahwa pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi

Corresponding author : dasrul.darni@yahoo.com

dalam medium isotonis seperti Earle's *Balance Salt Solution* (EBSS) diperoleh peningkatan persentase spermatozoa motil dengan morfologi yang normal (Shakarriz *et al.*, 1995; Dasrul, 1999; Hughes *et al.*, 1999). Namun demikian, proses pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada membran plasma spermatozoa, sehingga mempengaruhi motilitas dan pola kapasitas spermatozoa. Hasil penelitian Shakarriz *et al.* (1995) menunjukkan adanya penurunan yang bermakna terhadap persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa manusia setelah pencucian dengan sentrifugasi. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Dasrul (1999) bahwa di temukan penurunan persentase membran plasma utuh dan motilitas spermatozoa kambing PE setelah pencucian dengan setrifugasi pada kecepatan 2250 rpm selama 10 menit.

Beberapa peneliti terdahulu menjelaskan bahwa terjadinya penurunan kualitas spermatozoa setelah pencucian dengan sentrifugasi diakibatkan oleh adanya peningkatan senyawa oksigen reaktif sebagai akibat dari meningkatnya metabolisme spermatozoa selama dan setelah proses pencucian. Hasil penelitian Iwazaki dan Gagnon (1992) menunjukkan pencucian spermatozoa manusia dengan sentrifugasi berkecepatan 2000 rpm selama 10 menit, di temukan peningkatan senyawa oksigen reaktif 4X lebih tinggi dari spermatozoa basal. Demikian juga hasil penelitian Dasrul (2005) menunjukkan bahwa spermatozoa kerbau yang di cuci dengan sentrifugasi pada kecepatan 2250 rpm selama 10 menit di temukan adanya peningkatan senyawa oksigen reaktif 2X dari spermatozoa sebelum pencucian. Peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif oleh spermatozoa ini berkorelasi negatif dengan kualitas spermatozoa. Untuk meminimalkan penurunan kualitas spermatozoa selama pencucian dengan sentrifugasi dapat dilakukan dengan cara menambahkan anti oksidan dalam medium pencucian.

Vitamin E (*alfa tocopherol*) merupakan salah satu vitamin yang bersifat sebagai anti oksidan yang larut dalam lemak yang mampu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai (Suryohudoyo, 1995). Vitamin E berfungsi sebagai anti oksidan intra seluler yang paling kuat dalam

mencegah peroksidasi asam lemak tak jenuh di dalam dan di dinding sel, sehingga dapat menghindari kerusakan peroksidatif yang berpengaruh terhadap viabilitas dan fertilitas spermatozoa (Donnelly *et al.*, 1999; Agarwall *et al.*, 2004). Penambahan vitamin E dalam media pengencer selama proses pencucian untuk mempertahankan kualitas spermatozoa telah banyak dilakukan. Hughes *et al.* (1998) membuktikan bahwa penambahan vitamin E 200-500 mikrogram dalam medium pencucian pada spermatozoa manusia dapat menghambat penurunan motilitas dan kerusakan DNA spermatozoa. Demikian juga Donnelly *et al.* (1999) melaporkan bahwa penambahan vitamin E sebesar 0,1 dan 0,2gr/100 ml pada medium pencucian spermatozoa dapat meningkatkan viabilitas dan daya fertilitas spermatozoa manusia. Namun penambahan vitamin E dalam medium pencucian spermatozoa sapi Brahman hasil pembekuan dengan sentrifugasi sampai saat ini informasinya masih sangat terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati efektivitas penambahan vitamin E dalam medium pencucian dengan sentrifugasi terhadap persentase motilitas dan hidup spermatozoa sapi Brahman. Hasil penelitian ini di harapkan dapat memberikan suatu informasi yang berguna penambahan vitamin E dalam medium pencucian sebagai bahan pelindung terhadap reaksi peroksidasi lipid yang dapat merusak membran sel sehingga dapat mempertahankan kualitas spermatozoa sapi Brahman.

METODE PENELITIAN

Thowing dan Pencucian Spermatozoa

Straw (semen beku) sapi Brahman yang dibeli atau dipesan dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, Jawa Barat yang sudah ada di dalam kontainer nitrogen di keluarkan satu persatu untuk di lakukan proses thawing, yaitu dengan cara direndam di dalam becker glass yang sudah berisi air hangat dengan suhu 37⁰ c selama 1 menit. Kemudian straw dikeluarkan dan dipotong ujung bawahnya dengan gunting, selanjutnya straw dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge yang telah berisi larutan EBSS sebanyak 2 ml yang telah ditambahkan anti oksidan vitamin E sesuai dengan kelompok perlakuan (Vit E 0,0 gr/100ml EBSS + (K₀) ; Vit E 0,1 gr/100ml

EBSS (K₁); Vit E 0,2 mg/100ml EBSS (K₂) dan Vit E 0,3 gr/100 ml EBSS (K₃), secara hati-hati jangan menyentuh permukaan media. Selanjutnya potong ujung atas straw dengan gunting, sehingga semen akan turun/masuk kedalam media perlakuan. Tabung sentrifuge yang telah berisi semen ditutup dan segera di sentrifuge pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Kemudian dengan menggunakan pipet pastur steril buang supernatannya dan pellet yang tertinggal diresuspensi dengan 2 ml medium masing-masing perlakuan dan sentrifugasi lagi dengan kecepatan yang sama dengan yang pertama. Selanjutnya supernatan dibuang dan resuspensi lagi dengan 1,5 ml medium masing-masing perlakuan melalui dinding tabung, biarkan selama 15 menit dalam posisi tabung miring 60°. Dengan menggunakan pipet pastur ambil suspensi semen pada sepertiga bagian atas dan evaluasi kualitas spermatozoa (persentase motilitas dan hidup mati spermatozoa).

Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan menurut standart baku BIB singosari (Zenichero dkk. 2002). Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan menggunakan gelas obyek yang ditetesi 10-15 µl semen dan tutup dengan gelas penutup. Siapan diperiks dengan pembesaran 400 kali menggunakan mikroskop cahaya biasa atau mikroskop fase kontras. Spermatozoa yang motil akan nampak bergerak maju ke depan. Selanjutnya spermatozoa yang motil dihitung dan diberi jumlah seluruh spermatozoa yang tampak dalam satu lapangan pandang, dan dinyatakan dalam persen (%).

Pemeriksaan Hidup Spermatozoa

Pemeriksaan persentase hidup spermatozoa dilakukan menurut standart baku BIB Singosari (Zenichero dkk. 2002). Perhitungan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan teknik pewarnaan dengan mencampurkan semen dan larutan eosin negrosin pada gelas obyek, kemudian dibuat preparat ulas dan dikeringkan. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna sedangkan spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna atau berwarna putih. Selanjutnya spermatozoa yang hidup dihitung dan dibagi jumlah seluruh spermatozoa yang tampak (hidup dan mati)

dalam satu lapangan pandang, dan dinyatakan dalam persen (%).

Pemeriksaan MPU Spermatozoa

Sebanyak 0,1 ml suspensi sperma hasil pencucian ditambahkan ke dalam 9,9 ml larutan Hypoosmotik 0,032 m (dibuat dari 7,35gr Na Citrat 2H₂O, 13,52gr fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades) dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C (suhu kamar). Selanjutnya di buat preparat ulas tipis dengan mencampurkan 1 tetes larutan diatas dengan 1 tetes eosin, diamati dengan mikroskop biokuler dengan pembesaran 400X. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma yang utuh di tandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti dengan ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedangkan spermatozoa yang membran plasmanya sudah rusak di tandai dengan tidak ada pembengkakan kepala dan ekor yang lurus.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kelompok perlakuan penambahan vitamin E dalam medium (Vit E 0,0 gr/100ml medium + (K₀) ; Vit E 0,1 gr/100ml medium (K₁); Vit E 0,2 mg/100ml medium (K₂) dan Vit E 0,3 gr/100 ml medium (K₃), tiap kelompok diulangi sebanyak 5 kali. Data persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran spermatozoa dan hidup mati spermatozoa, yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *analisis of variance* (ANOVA) satu arah, bila terdapat perbedaan kontrol dengan perlakuan, data selanjutnya diuji dengan uji berganda Duncant pada tingkat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) (Steel and Torrie,1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Spermatozoa

Rata-rata kualitas spermatozoa yang diukur berdasarkan persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran spermatozoa sapi Brahman setelah pencucian dengan sentrifugasi dalam medium EBSS yang ditambahkan dengan berbagai dosis vitamin E dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata (\pm SD) Persentase Kualitas Spermatozoa setelah perlakuan penambahan vitamin E dalam medium EBSS

Perlakuan	Kualitas Spermatozoa		
	% Motilitas Spermatozoa	% Spermatozoa Hidup	% MPU Spermatozoa
K0	68,20 \pm 08,64 ^a	67.16 \pm 4.86 ^a	73,24 \pm 1,75 ^a
K1	69,00 \pm 10,65 ^a	73.85 \pm 4.16 ^b	82,90 \pm 4,36 ^b
K2	85,40 \pm 04,22 ^b	85.68 \pm 2.25 ^c	88,24 \pm 9,91 ^c
K3	79,60 \pm 06,58 ^c	79.98 \pm 3.11 ^d	83,28 \pm 4,99 ^b

Keterangan : Nilai konsentrasi yang diikuti dengan superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Persentase Motilitas Spermatozoa

Berdasarkan Tabel 1 diatas terlihat bahwa persentase motilitas pada ketiga kelompok perlakuan menambahkan vitamin E dalam medium EBSS lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa kelompok kontrol. Persentase motilitas spermatozoa tertinggi ditemukan pada kelompok K₂ yaitu %, 85,4 \pm 4,22 % diikuti kelompok K₃; K₁ dan K₀ secara berturut turut adalah 79,6 \pm 6,58 %; 69,0 \pm 10,65 % dan 68,2 \pm 8,64 %.

Hasil analisis statistik menggunakan ANOVA yang dilanjutkan uji Berganda Duncant menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan K₂ lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₃; K₁ dan K₀. Persentase motilitas spermatozoa pada kelompok K₃ lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₁ dan K₀. Sedangkan persentase motilitas spermatozoa pada kelompok K₁ lebih tinggi secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₀. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan vitamin E dalam medium EBSS pada proses pencucian dengan sentrifugasi berpengaruh terhadap persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman. Penambahan vitamin E 0,2 mg/100ml dalam medium EBSS menghasilkan tingkat persentase motilitas spermatozoa yang terbaik. Fakta tersebut menunjukkan bahwa penambahan vitamin E 0,2 gr/100 ml EBSS dapat memperbaiki komposisi dan kondisi medium pencuci. Keadaan tersebut diduga karena dengan penambahan vitamin E terjadi optimalisasi laju fruktolisis sehingga kebutuhan energi untuk motilitas dapat terpenuhi. Disamping itu diduga vitamin E

mampu mengikat oksigen reaktif yang terdapat dalam sel sehingga dapat mencegah terbentuknya peroksidasi lipid yang dapat menghambat glikolisis dan motilitas spermatozoa. Chinoy et al (1991) melaporkan bahwa penambahan vitamin E yang dikombinasikan dengan kalsium dapat mempertinggi kadar Na + dan K + serta aktifitas ATPase dan suksinat dehidrogenase, sehingga mengakibatkan terjadinya peningkatan metabolisme energi spermatozoa kelinci. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Donnelly *et al.* (1995) bahwa penambahan vitamin E sebesar 100 -300 mg/100 ml dalam medium Earle's selama proses pencucian spermatozoa manusia menghasilkan persentase motilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa penambahan vitamin E.

Persentase Spermatozoa Hidup

Berdasarkan Tabel 2 diatas terlihat bahwa persentase spermatozoa hidup pada ketiga kelompok perlakuan menambahkan vitamin E dalam medium EBSS lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa kelompok kontrol. Persentase hidup spermatozoa tertinggi ditemukan pada kelompok K₂ yaitu %, 85.68 \pm 2.25 % diikuti kelompok K₃; K₁ dan K₀ secara berturut turut adalah 79.98 \pm 3.11 %; 73.85 \pm 4.16 % dan 67.16 \pm 4.86 %.

Hasil analisis statistik ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Duncant menunjukkan bahwa persentase spermatozoa hidup pada kelompok K₂ lebih tinggi secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₃; K₁ dan K₀. Persentase spermatozoa hidup pada kelompok K₃ lebih tinggi secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₁ dan K₀. Persentase spermatozoa hidup pada kelompok K₁ lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₀. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan vitamin E dalam medium EBSS pada proses pencucian dengan sentrifugasi berpengaruh positif terhadap persentase spermatozoa hidup sapi Brahman. Penambahan vitamin E 0,2 gr/100ml menghasilkan persentase spermatozoa hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan vitamin E 0,1 gr/100 ml dan vitamin E 0,3 gr/100 ml dalam medium EBSS.

Tingginya persentase spermatozoa hidup pada kelompok perlakuan penambahan vitamin E dalam medium EBSS pada proses

pencucian spermatozoa, berhubungan dengan kemampuan vitamin E dalam menangkap senyawa oksigen reaktif, memutus reaksi peroksidasi dengan cara melepas ion hidrogen bersama elektronnya. Kejadian peroksidasi lipid dapat menyebabkan rusaknya atau goyahnya hubungan membran plasma. Kerusakan membran plasma spermatozoa menyebabkan terhentinya proses metabolisme untuk menghasilkan energi karena keluar dan terbebasnya enzim-enzim yang diperlukan dalam metabolisme. Sehingga ATP yang diperlukan oleh spermatozoa untuk hidup dan motil menjadi rendah, selanjutnya menyebabkan kematian spermatozoa. Rendahnya persentase hidup spermatozoa pada dosis 0,1 gr/100 ml EBSS (K1), nampaknya berhubungan dengan pengaruh antioksidan vitamin E yang belum optimal jika dibandingkan dengan dosis 0,2 gr/100 ml EBSS (K2), Sedangkan pada dosis 0,3 gr/100 ml EBSS (K3) kemungkinan terjadi pengaruh negatif vitamin E sehingga menyebabkan terjadinya penurunan persentase hidup spermatozoa.

Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa

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

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



Gambar 1. membran plasma utuh spermatozoa sapi brahman yang diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X; a) spermatozoa dengan membran plasma utuh b) spermatozoa dengan membran plasma rusak

Dari tabel 1 diatas terlihat bahwa persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi Brahman pada ketiga kelompok perlakuan penambahan vitamin E dalam medium EBSS lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa kelompok kontrol. Rata-rata persentase MPU spermatozoa yang ditemukan pada kelompok K₀ dan perlakuan K₁, K₂ dan K₃ secara berturut turut adalah 73,24 ± 1,75 %; 82,90 ± 4,36 %; 88,24 ± 9,91 % dan 83,28 ± 4,99 %.

Hasil analisis statistik terhadap persentase MPU spermatozoa menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan penambahan vitamin E. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan penambahan vitamin E dalam pencucian spermatozoa Sapi Brahman dengan sentrifugasi mampu menghambat kerusakan integritas membran plasma spermatozoa. Hasil penelitian ini sejalan dengan pernyataan yang diungkapkan oleh Hafez (2000) bahwa proses pencucian spermatozoa dengan metode sentrifugasi dapat menyebabkan kerusakan pada membran spermatozoa.

Persentase MPU spermatozoa pada kelompok K₃ lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₀, dan lebih tinggi secara tidak nyata ($p > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₁ dan lebih rendah secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K₂. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok K₂ lebih tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok K₀ dan lebih

tinggi secara tidak nyata ($p>0,05$) dibandingkan dengan kelompok K_1 maupun dengan kelompok K_3 . Persentase MPU spermatozoa pada kelompok K_1 lebih tinggi secara nyata ($p<0,05$) di bandingkan dengan kelompok K_0 .

Tingginya persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan menambahkan vitamin E dalam medium pencucian EBSS berhubungan dengan kemampuan vitamin E dalam menghambat terjadinya peroksidasi lipid pada membran spermatozoa akibat meningkatnya senyawa oksigen reaktif dalam medium. Kejadian peroksidasi lipid dapat menyebabkan rusaknya membran plasma spermatozoa secara permanen sebagai akibat rantai-rantai asam lemak membran. Dengan menambahkan vitamin E di dalam medium pencucian pada proses sentrifugasi di harapkan dapat mempertahankan dan melindungi membran sel dari serangan senyawa oksigen reaktif. Hasil sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan Halliwell dan Gutteridge (1999) bahwa vitamin E bekerja di membran sel dan di dalam sel untuk mencegah peroksidasi lipid. Vitamin E juga berfungsi sebagai anti oksidan intra seluler yang paling kuat, dalam mengurangi atau mencegah peroksidasi asam lemak tak jenuh di dalam dan di dinding sel (Suryohudoyo, 2000).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan :

Penambahan vitamin E dalam medium pencucian EBSS dengan sentrifugasi berpengaruh terhadap persentase motilitas dan hidup spermatozoa sapi Brahman.

Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengamati pengaruh penambahan vitamin E pada proses pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi terhadap daya fertilitas spermatozoa
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengungkapkkan kerusakan jaringan khususnya pada level protein struktural sebagai manifestasi akibat pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi .

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., I. Ikemoto, N.K.R. Loughlin. 2004. Level of reactive oxygen species before and after sperm preparation: Comparative of swim up and filtration method. *Fertility and sterility*. 79:829-843.
- Agarwal, A., I. Ikemoto and K.R. Loughlin, 2004. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim up and L4 filtration methods. *Arch Androl* 32: 169 - 174.
- Chinoy, N. J., E Sequeirina and M. V. Narayana. 1991. Effects of Vitamin C and calciom on the reversibility of fluoridde-indecute alterations in spermatozoa of the rabbits (abstr). *Floride*. 24:29-39.
- Dasrul, M. Adam, A. Damhoeri dan Sunarti, 1999. Uji kualitas, Integritas membran spermatozoa kerbau lumpur hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien percoll. Laporan penelitian PHB VI tahun pertama. Universitas Syiah Kuala Banda Aceh.
- Dasrul, 2005. Peran Senyawa Oksigen Reaktif Dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau lumpur Hasil Sentrifugasi . Disertasi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Donnelly, E.T., M. McClure and S.E. Lewis, 1999. The effect of ascorbate and alfa tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hidrogen peroxida – induced DNA damage ion human spermatozoa, *Joernal Mutagenesis*, Sep; 14 (5): 505 – 512.
- Halliwell, B and J.M.C.Gutteridge, 1999. Free radicals in Biology and Medicine. Third edition, Oxford : Oxford University Press, pp: 1 – 35, 246 – 350; 664 – 667.
- Hafez, E. S. E. (2000). Semen Evaluation. *In: Reproduction in Farm Animals*. Hafez, E. S. E. (Ed.) 7th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Hughes C.M., S.E., Lewis, Mc Kelvey – V.J.Martin. and W.Thompson. 1998. The effects of antioxidant supplementation during percoll

- preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.* May. 13 (5) : 1240 – 7.
- Hughes CM., SE. Lewis, V. J. McKelvey – Martin and W. Thompson, 1999. The effects of antioxidant supplementation during percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.* May. 13 (5) : 1240 – 7.
- Iwasaki A and C.Gagnon. 1992. Formation of reactive oxygen spesies in spermatozoa of infertile patient. *Fertil. Steril.* 57; 408 – 416.
- Shekarriz M., A.J. Thomas and A. Agarwal. 1995. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol* 28: 31 – 35.
- Steel, R.G.D and J. Torrie. 1991. Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biometrik. Alih bahasa Bambang Sumantri, Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Sukra Y. I. Djuwita. A. Boediono dan R. Golfiani. 1992. Studi tentang perkembangan teknik fertilisasi in vitro , kultur, pewarnaan kromosom dan penyayatan embrio dalam proses perekayasaan embrio. Laporan Penelitian IPB-Bogor.
- Supriatna I. dan Pasaribu, 1992. In vitro fertilisasi, transfer embrio dan Pembekuan embrio. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor
- Suryohudoyo, P. 1995. Oksidan, anti – oksidan dan radikal bebas dalam Simposium dampak negatif radikal bebas pada organ tubuh dan manfaatnya antioksidan. Fakultas Kedokteran Unair, Surabaya.
- Suryohudoyo, P. 2000. *Ilmu Kedokteran Molekuler*. Cetakan Pertama, Jakarta; CV. Sagung Seto. Hal 31 – 47.
- Zenichiro. K. Herlantien, Sarastina, 2002. Intruksi Praktis Teknologi Prosessing Semen Beku Pada Sapi, Jica - BIB Singosari, Malang.

