

Analisis Kerusakan Oksidatif dan Pemanfaatan Antioksidan pada Kryopreservasi Semen Sapi Peranakan Ongole Indonesia

INTISARI

Kurniawan Dwi Prihantoko
18/436447/SKH/00113

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi motilitas sperma dan integritas fisiologis sperma selama proses pembekuan. Kerusakan yang disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS) merupakan salah satu faktor yang dianggap paling mempengaruhi. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ROS merupakan pelaku utama dalam rusaknya membran spermatozoa. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pembentukan ROS intraseluler dan hubungannya dengan motilitas sperma, aktifitas mitokondria, kerusakan kromatin, dan kerusakan DNA selama proses pembekuan semen dari sapi peranakan Ongole (PO) Indonesia serta pemanfaatan antioksidan dalam proses proses kryopreservasi semen sapi PO. Penelitian ini dibagi menjadi 3 tahap penelitian, yaitu profil tingkat kerusakan sel dan stres oksidatif spermatozoa semen sapi PO yang ada di Indonesia, kemudian penelitian tahap kedua pengaruh penambahan antioksidan pada proses kryopreservasi berbasis pengencer skim-lesitin kedelai terhadap tingkat kerusakan sel dan stres oksidatif spermatozoa semen PO, dan yang terakhir penelitian tahap ketiga yaitu peroksidasi lipid dan aktifitas antioksidan spermatozoa semen sapi PO berbasis pengencer antioksidan. Penelitian tahap pertama dilakukan menggunakan 90 sampel straw Sapi PO dari 9 ekor Sapi pejantan peranakan Ongole. Pemeriksaan semen beku yang dilakukan antara lain, motilitas sperma, viabilitas sperma, pemeriksaan Integritas membrane Spermatozoa, pemeriksaan integritas akrosom spermatozoa, pemeriksaan aktifitas mitokondria spermatozoa, pemeriksaan kerusakan kromatin spermatozoa, pemeriksaan *reactive oxygen species* (ROS) dan pemeriksaan fragmentasi DNA spermatozoa. Penelitian Tahap kedua menggunakan 80 sampel semen sapi yang ditampung dari 4 ekor sapi PO. Sampel kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan (5 μ M genistein, 10 μ M genistein, 1 mM glutathione, 2 mM glutathione dan kontrol) sebelum kemudian dilakukan prosesing semen beku. Parameter pengamatan yang dilakukan sama seperti pada penelitian tahap pertama. Sedangkan untuk peneltian tahap ketiga meliputi pemeriksaan hasil peroksidasi lipid dengan parameter kadar Malondialdehyde (MDA) dan aktivitas antioksidan dengan parameter Superoxide dismutase (SOD) melalui metode ELISA. Penelitian dilakukan menggunakan 80 sampel semen sapi yang ditampung dari 4 ekor sapi PO yang telah dibagi menjadi 5 perlakuan hasil dari penelitian tahap kedua. Dilakukan analisis deskriptif dan analisis korelasi untuk data hasil penelitian pertama dan *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk data hasil penelitian kedua serta ketiga. Berdasarkan hasil penelitian tahap pertama dapat disimpulkan bahwa tingkat stres oksidatif spermatozoa semen sapi PO berada pada kondisi yang cukup tinggi, sedangkan kerusakan sel dan fragmentasi DNA spermatozoa

semen sapi PO berada pada kondisi yang aman. Berdasarkan hasil penelitian tahap pertama juga dapat disimpulkan bahwa ROS berpengaruh atau memiliki hubungan yang kuat dengan motilitas, integritas membrane, integritas akrosome, dan aktifitas mitokondria spermatozoa. Hasil penelitian ini juga menyimpulkan bahwa kerusakan DNA tidak memiliki hubungan yang signifikan dengan ROS. Berdasarkan beberapa hasil tersebut dapat disimpulkan pendapat bahwa ROS tidak menyerang spermatozoa secara bertahap tetapi mampu mempengaruhi bagian spermatozoa secara spesifik, kemudian pendapat yang menyatakan bahwa ROS menjadi faktor utama yang menyebabkan kerusakan DNA tidak terbukti pada penelitian ini. Berdasarkan hasil penelitian tahap kedua, dapat disimpulkan bahwa penambahan antioksidan genistein terutama dengan konsentrasi 10 μ M dapat mempertahankan parameter seluler serta menekan stres oksidatif spermatozoa selama proses kryopreservasi ($P < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian tahap ketiga, dapat disimpulkan bahwa penambahan antioksidan genistein dengan konsentrasi yang tepat dapat menekan peroksidasi lipid spermatozoa, terutama pada penambahan antioksidan genistein 10 μ M ($P < 0,05$).

Kata Kunci : Sapi Peranakan Ongole, Semen Beku, Stres oksidatif, Kerusakan seluler spermatozoa, Antioksidan,

Oxidative Damage Analysis and Antioxidants Supplementation in Cryopreservation of Indonesian Ongole Bull Sperm

ABSTRACT

Kurniawan Dwi Prihantoko
18/436447/SKH/00113

Several factors affect sperm motility and sperm physiological integrity during the freezing process. Damage caused by reactive oxygen species (ROS) is one of the factors that is considered the most influential. Several previous studies stated that ROS is the main actor in spermatozoa membrane damage. This study was conducted to determine the activity of intracellular ROS and its relationship to sperm motility, mitochondrial activity, chromatin damage, and DNA damage during the semen freezing process from Indonesian Ongole (PO) bulls and the supplementation of antioxidants in the PO bulls sperm cryopreservation process. This research was divided into 3 research phases, namely cell damage level and oxidative stress of PO bulls spermatozoa in Indonesia, then the second phase of the research was the effect of antioxidants supplementation to the cryopreservation process based on soy skim-lecithin extender on the level of cell damage and oxidative stress from PO bulls spermatozoa, and finally the third stage of research, lipid peroxidation and antioxidant activity of PO bulls spermatozoa based on antioxidant extender. The first phase of the research was conducted using 90 PO bulls straw samples from 9 Ongole grade bulls. Frozen semen examinations carried out included sperm motility, sperm viability, sperm membrane integrity examination, spermatozoa acrosome integrity examination, spermatozoa mitochondrial activity examination, spermatozoa chromatin damage examination, reactive oxygen species (ROS) examination, and spermatozoa DNA fragmentation examination. The study's second phase used 80 samples of bull semen collected from 4 PO bulls. The samples were then divided into 5 treatment groups (5 μ M genistein, 10 μ M genistein, 1 mM glutathione, 2 mM glutathione, and control) before processing frozen semen. The parameters of the observations made were the same as in the first stage of the study. Meanwhile, the third phase of the research included examining the results of lipid peroxidation using the Malondialdehyde (MDA) level parameter and antioxidant activity using the Superoxide dismutase (SOD) parameter through the ELISA method. The study was conducted using 80 bull semen samples collected from 4 PO bulls which had been divided into 5 treatments resulting from the second phase of the study. Descriptive analysis and correlation analysis were performed for the first research data and One-way Analysis of Variance (ANOVA) for the second and third research data. Based on the results of the first phase of the study, it can be concluded that the oxidative stress level of PO bull sperm spermatozoa was in a fairly high condition, while the cell damage and DNA fragmentation of PO bull sperm spermatozoa were in normal conditions. Based on the results of the first phase of the study it can also be concluded that ROS has an effect or has a strong relationship with motility, membrane integrity, acrosome integrity, and mitochondrial activity of spermatozoa. The results of this study also concluded that DNA damage did not have a significant

relationship with ROS. Based on these results it can be concluded that ROS does not impact spermatozoa gradually but can affect the spermatozoa specifically, then the opinion which states that ROS is the main factor causing DNA damage was not proven in this study. Based on the results of the second phase of the study, it can be concluded that the supplement of genistein antioxidant, especially at concentration of 10 μM , could maintain cellular parameters and suppress the oxidative stress of spermatozoa during the cryopreservation process ($P < 0.05$). Based on the results of the third phase of the study, it can be concluded that the addition of the genistein antioxidant at the right concentration can suppress the lipid peroxidation of spermatozoa, especially with the addition of the antioxidant genistein 10 μM ($P < 0.05$).

Keywords: Ongole grade bull, frozen semen, oxidative stress, spermatozoa cellular damage, antioxidants