

**PAJANAN RADIASI GELOMBANG
ELEKTROMAGNETIKRADIOFREKUENSITELEPON SELULER
TERHADAP KUALITAS DAN FUNGSIONALITASPERMATOZOA
MANUSIA**

**Kajian *in vitro* Konsentrasi, Motilitas, Morfologi,
Apoptosis, Kalsium Intraseluler dan Ekspresi *Voltage-Gated Calcium
Channel* Spermatozoa**

Disertasi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat S-3



Diajukan oleh

Isna Qadrijati

11/324335/SKU/421

**Kepada
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN DAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
April 2016**

Lembar Pengesahan

**PAJANAN RADIASI GELOMBANG ELEKTROMAGNETIK
RADIOFREKUENSI TELEPON SELULER TERHADAP KUALITAS
DAN FUNGSIONALITAS SPERMATOZOA MANUSIA**

**Kajian *in vitro* Konsentrasi, Motilitas, Morfologi,
Apoptosis, Kalsium Intraseluler dan Ekspresi Voltage-Gated Calcium
Channel Spermatozoa**

Disertasi

Bidang Biomedik
Program Studi Ilmu Kedokteran dan Kesehatan

Telah diperbaiki sesuai masukan Tim Penguji, Penilai dan Pembimbing
pada tanggal 12 April 2016

Telah disetujui oleh :

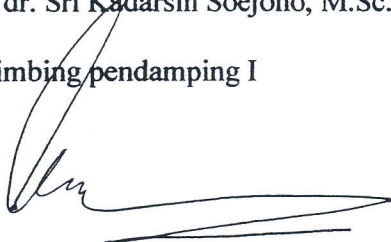
Pembimbing Utama



Tanggal: 21 - 04 - 2016

(Prof. dr. Sri Kadarsih Soejono, M.Sc., Ph.D.)

Pembimbing pendamping I



Tanggal: 22 - 04 - 2016

(Prof. Dr. Moch. Anwar, Sp.OG., M.Med.Sc.)

Pembimbing penamping II



Tanggal : 22 - 04 - 2016

(Dr. Muhammad Gufron, MS.)

PERNYATAAN PROMOVENDUS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam penulisan isi disertasi ini tidak terdapat karya tulis atau tulisan yang pernah diajukan untuk memperoleh derajat Doktor dalam Ilmu Kedokteran dan Kesehatan pada Universitas Gadjah Mada, dan sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya tulis yang pernah di tulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang diacu tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, Oktober 2015

Yang menyatakan,



Isna Qadrijati

HALAMAN PERSEMBAHAN

Penulis persembahkan disertasi ini kepada :

Ayahanda : H. Drs. Asjhuri, SU. (Alm.)

Ibunda : Hj. Murtini

Suamiku : H. Drs. Hardjono, M,Si. Psi.

Anak-anakku : 1. Afina Naharindya Vidyandita
2. Nurindria Naharista Vidyapramatya

Almamaterku : 1. FK Universitas Sebelas Maret Surakarta
2. FK Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas semua kemudahan dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi dengan judul **“Pajanan Radiasi Gelombang Elektromagnetik Radiofrekuensi Telepon Seluler terhadap Kualitas dan Fungsionalitas Spermatozoa Manusia”**. Kajian *in vitro* Konsentrasi, Motilitas, Morfologi, Apoptosis, Kalsium Intraseluler dan Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* Spermatozoa. Penulisan disertasi ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi telepon seluler terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa manusia. Disertasi ini sebagai pemenuhan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Dalam penyusunan disertasi ini penulis banyak sekali mengalami kesulitan, hambatan dan kendala yang disebabkan oleh keterbatasan pengetahuan, kemampuan dan wawasan serta pola pikir penulis, namun berkat bantuan dan bimbingan serta dorongan yang tulus dari berbagai pihak dan disertai keinginan dan usaha yang sungguh-sungguh akhirnya hambatan dapat diatasi dan disertasi ini dapat terselesaikan sebagaimana yang diharapkan. Selama pendidikan, penulis banyak mendapat kesempatan untuk menimba ilmu yang seluas-luasnya, sehubungan dengan hal tersebut perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. Dr. Ravik Karsidi, MS., selaku Rektor Universitas Sebelas Maret Surakarta, yang telah memberi izin dan dukungannya kepada penulis untuk mengikuti pendidikan program Doktor di FK UGM.
2. Prof. Dr. dr. Hartono, MSi., selaku Dekan Fakultas Kedokteran UNS yang telah memberi izin dan kepercayaan, dukungan kepada penulis untuk menempuh program Doktor di FK UGM dan atas segala dukungan, kesempatan dan bantuan yang diberikan untuk menyelesaikan studi lanjut ini.
3. Prof. Ir. Dwikorita Karnawati, M.Si.,PhD. selaku Rektor Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang telah menerima penulis sebagai mahasiswa untuk mengikuti pendidikan program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan pada Fakultas Kedokteran UGM.
4. Prof. Dr. dr. Teguh Aryandono, Sp.B(K) Onk. Selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, yang telah menerima penulis sebagai mahasiswa untuk mengikuti pendidikan program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan pada Fakultas Kedokteran UGM.
5. Prof. dr. Sofia Mubarika, M.Med.Sc., PhD selaku Ketua Program Doktor Fakultas Kedokteran UGM yang telah memberi izin dan kesempatan pada penulis untuk memperluas wawasan keilmuan dalam mengikuti pendidikan S3 pada program Ilmu Kedokteran dan Kesehatan FK UGM.
6. Prof.dr.Sri Kadarsih Soejono, M.Sc.,Ph.D, selaku pembimbing utama (Promotor) yang telah dengan begitu sabar dan selalu memberikan arahan, bimbingan, semangat kepada penulis dari awal pendidikan sampai

terselesaikannya penelitian disertasi ini, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan umur panjang, kesehatan dan keselamatan kepada beliau.

7. Prof. dr. Muhammad Anwar, Sp.OG.,M.Med.Sc., selaku pembimbing pendamping I (Co-Promotor I) yang telah memberikan masukan dan saran dalam menyelesaikan disertasi ini, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan kepada beliau.
8. Dr. Muhammad Gufron, MS., selaku pembimbing pendamping II (Co-Promotor II) yang telah memberikan arahan, ide-ide bimbingan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian disertasi ini, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan kepada beliau.
9. Prof. dr. Soedjono Aswin, Ph.D., selaku penilai yang telah menilai dan memberikan masukan dan bimbingan kepada penulis. Terima kasih atas masukan, dan bimbingannya selama ini, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan umur panjang dan kesehatan kepada beliau.
10. Prof. dr. Hari Kusnanto, SU.,Dr.PH., selaku penilai yang telah menilai dan memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis. Terima kasih atas arahan dan dukungannya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan dan kesuksesan kepada beliau.
11. Dr. dr. Ita Fauzia Hanoum, MCE.,selaku penilai yang telah menilai dan memberikan masukan dan bimbingan kepada penulis. Terima kasih atas masukan, dan bimbingannya selama ini, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan umur panjang dan kesehatan kepada beliau.

12. Prof. Dr.dr. Susilo Wibowo, Sp.And., MS.Med., selaku pengujiluar yang telah menilai dan memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis. Terima kasih atas arahan dan dukungannya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan dan kesuksesan kepada beliau.
13. Dr. dr. Dicky Moch. Rizal, Sp.And., AIFM., FIAS., selaku penguji, penilai yang telah banyak memberikan asupan dan bimbingan kepada penulis, sehingga penulis dapat lebih menyempurnakan penyusunan disertasi ini. Terima kasih atas arahan dan dukungannya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan kepada beliau.
14. Bapak Farid Abdullahteknisi Laboratorium Patologi Klinik FK UGM, Ibu Nia laboran Laboratorium Faal FK UGM, dan Bapak Suhardi teknisi Laboratorium Histologi FK UGM, dan Ibu Sari Palupi dari Klinik Fertilitas Soekar RS. dr. Muwardi Surakarta, yang telah membantu penulis, terima kasih atas segala bantuannya selama penelitian. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan kepada beliau semuanya.
15. Segenap staf edukatif dan non edukatif program Doktor dan Ilmu Kesehatan FK UGM yang telah banyak membantu dan mempermudah segala urusan administratif sehingga dapat terselesai dengan baik.
16. Kedua orang tua penulis yaitu ayahanda H. Drs. Ashjuri, SU. (Almarhum),ayahanda tercinta seorang mentor, teladan hidup, ayah yang sangat dibanggakan, dan “Ayah, obor itu berpindah tangan di saat yang tepat”, serta Ibu Hj. Murtini, ibunda tercinta yang dengan sabar mendidik penulis sepanjang hidup mulai dalam kandungan sampai sekarang,

terimakasih atas segalanya, kasih sayang dan cinta yang tulus diberikan serta doa yang selalu ibunda munajatkan untuk penulis. Terima kasih juga kepada ayahanda mertua Sastrohartono (Almarhum) dan ibunda mertua Suharmi (Almarhumah), beserta keluarga besar Sastrohartono yang senantiasa memberikan dukungan dan doa sehingga terselesainya disertasi ini. Semoga amal kebaikan beliau semua di terima Allah SWT.

17. Suami tercinta H. Drs. Hardjono, M.Si. Psi.,yang selalu mendoakan, mendukung dan memberikan kesempatan, kepercayaan, semangat, motivasi dan dengan sabar merelakan waktunya untuk penulis menyelesaikan studi. Terimakasih atas semua bantuan, pengertian, dan segalanya selama ini dan anak-anakku tercintaAfina Naharindya Vidyanindita dan Nurindria Naharista Vidyapramatya, dua bidadariku yang merupakan karunia Allah yang luar biasa dalam hidupku, yang menjadi sumber semangat, kekuatan, motivasi dan inspirasi untuk menyelesaikan disertasi. Terimakasih untuk segala pengertian dan dukungan serta semangat yang telah diberikan serta saling pengertiannya dan dengan iringan doa, tabah dan sabar menunggu penantian yang belum tentu ujungnya. Semoga jasa-jasa pengorbanan suami dan anak-anakku menjadi amal kebaikan dan diterima Allah SWT.

18. Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan baik berupa dukungan tenaga, pikiran, waktu, dan motivasi, sehingga disertasi ini dapat terselesaikan, semoga Allah SWT

memberi balasan kepada Bapak/Ibu/Saudara/saudari menjadi amal
kebaikan.

Akhirnya penulis berharap semoga hasil disertasi ini bermanfaat untuk
pengembangan ilmu pengetahuan dan kesejahteraan masyarakat luas. Semoga
segala ilmu yang bermanfaat dan kemudahan yang diberikan kepada penulis akan
mendapat balasan yang terbaik dari Allah SWT.Aamiin.

Yogyakarta, 12 April 2016

Isna Qadrijati

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN UJIAN TERTUTUP.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PROMOVENDUS.....	v
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR TABEL	xxv
DAFTAR SINGKATAN	xxviii
ABSTRAK	xxix
ABSTRACT	xxx
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1

B. Pertanyaan Penelitian	7
C. Tujuan Penelitian	8
D. Manfaat Penelitian	9
E. Keaslian Penelitian	11
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	14
A. Radiasi EMW-RF Telepon Seluler	14
B. Anatomi Sistem Reproduksi Pria	23
1. Spermatogenesis dan Spermiogenesis	24
2. Struktur Spermatozoa Manusia	30
3. Apoptosis	32
C. <i>Voltage- Gated Calcium Channel</i> (VGCC)	41
1. Struktur <i>Voltage Gated Calcium Channel</i> (VGCC)	41
2. Bahan-bahan yang mempengaruhi fungsi VGCC	45
3. Pemeriksaan ekspresi VGCC	50
D. Ion Calsium	52
E. Mekanisme pajanan radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa	55

F. Landasan Teoritis...	55
G. Kerangka Teoritis	58
H. Kerangka Konseptual	59
I. Hipotesis	60
BAB III. METODE PENELITIAN	62
A. Jenis Penelitian	62
B. Tempat dan waktu penelitian	62
C. Subyek Penelitian	62
1. Sampel penelitian	62
2. Cara pengambilan sampel	63
D. Variabel Penelitian	64
E. Definisi Operasional Variabel	65
F. Alur Penelitian	70
G. Alat dan Bahan	73
1. Alat dan bahan pemeriksaan kualitas spermatozoa	73
2. Alat dan bahan pemeriksaan fungsionalitas spermatozoa	74
3. Alat dan bahan pembuatan preparat immunositokimia	74

H. Jalannya Penelitian	74
1. Penilaian sebelum penelitian	74
2. Penilaian pada masa perlakuan	75
a. Koleksi Semen	75
b. Persiapan Sampel sperma	76
c. Pengukuran Konsentrasi Spermatozoa	76
d. Pemeriksaan Motilitas spermatozoa	76
e. Pemeriksaan Morfologi spermatozoa	77
f. Pengukuran Apoptosis	78
g. Pengukuran Kalsium intraseluler spermatozoa	79
h. Pengukuran Ekspresi VGCC dengan pemeriksaan <i>immunocytochemistry</i> (ICC)	80
I. Etika Penelitian	82
J. Teknik Analisis Data	82
1. Analisis variabel	83
2. Uji Statistik	83
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	85

A. Hasil Penelitian	85
1. Uji Normalitas	85
2. Pengaruh pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel.....	87
a. Pengaruh pajanan ponsel terhadap kualitas spermatozoa....	87
1) Pengaruh pajanan ponsel terhadap konsentrasi spermatozoa.....	87
2) Pengaruh pajanan ponsel terhadap motilitas spermatozoa.....	90
3) Pengaruh pajanan ponsel terhadap morfologi spermatozoa	98
b. Pengaruh pajanan ponsel terhadap fungsionalitas spermatozoa.....	112
1) Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah sel apoptosis spermatozoa.....	112
2) Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah Ca intraseluler spermatozoa.....	116
c. Pengaruh pajanan ponsel terhadap ekspresi <i>Voltage-Gated Calcium Channel</i> (VGCC) spermatozoa	122
B. Pembahasan	130
1. Pengaruh pajanan ponsel terhadap kualitas spermatozoa.....	132

a. Pengaruh pajanan ponsel terhadap konsentrasi spermatozoa.....	132
b. Pengaruh pajanan ponsel terhadap motilitas spermatozoa	134
c. Pengaruh pajanan ponsel terhadap morfologi spermatozoa	139
2. Pengaruh pajanan ponsel terhadap fungsionalitas spermatozoa.....	144
a. Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah sel apoptosis spermatozoa	145
b. Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah Kalsium intraseluler spermatozoa	149
3. Pengaruh pajanan ponsel terhadap ekspresi <i>Voltage-Gated Calcium Channel</i> (VGCC) spermatozoa.....	151
C. Keterbatasan Penelitian.....	158
D. Upaya preventif terhadap pajanan radiasi ponsel.....	159
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN.....	162
A. Simpulan	162
B. Saran	162
RINGKASAN	164

SUMMARY	183
DAFTAR PUSTAKA	201
LAMPIRAN.....	213

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	: Mekanisme radiasi pada DNA.....	20
Gambar 2	: Spermatogenesis	24
Gambar 3	: Spermiogenesis	26
Gambar 4	: Struktur spermatozoa manusia	30
Gambar 5	: Mekanisme Apoptosis	33
Gambar 6	: Struktur GVCC	41
Gambar 7	: Bagian – bagian dari spermatozoa	43
Gambar 8	: Pengaturan Ca ²⁺ pada spermatozoa.....	50
Gambar 9	: Kerangka Teoritis.....	58
Gambar 10	: Kerangka Konseptual	59
Gambar 11	: Alur penelitian Tahap 1.....	71
Gambar 12	: Alur peneltian Tahap 2	72
Gambar 13	: Rerata konsentrasi spermatozoa yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	89

Gambar 14	: Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai tingkatan motilitas <i>slow progressive</i> (B) yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	92
Gambar 15	: Rerata persentase spermatozoa yang mempunyaitingkatan motilitas <i>non progressive</i> (C) yang terpajanradiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	95
Gambar 16	: Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai tingkatan motilitas <i>non - motile</i> (D) yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam	98
Gambar 17	: Gambaran mikroskopik spermatozoa normal.....	99
Gambar 18	: Rerata persentase spermatozoa dengan morfologi normal yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	100
Gambar 19	: Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi kepala yang terpajan radiasi ponsel secara <i>invitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	103
Gambar 20	: Gambaran mikroskopik spermatozoa dengan pewarnaan HE pembesaran 1000 x terdapat morfologi abnormal pada kepala, leher, dan ekor spermatozoa.....	107

Gambar 21	: Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi leher terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	108
Gambar 22	: Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi ekor yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	109
Gambar 23	: Rerata persentase kualitas spermatozoa yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> selama 1 jam.....	111
Gambar 24	: Gambar hasil analisis <i>flowcytometry</i> populasi spermatozoa pada R1.....	113
Gambar 25	: Gambar hasil analisis <i>flowcytometry</i> sel spermatozoa yang mengalami apoptosis (pewarnaan Annexin V Fluos dan Propidium iodium).....	113
Gambar 26	: Rerata persentase spermatozoa yang selnya mengalami apoptosisterpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	115
Gambar 27	: Gambar hasil analisis <i>flowcytometry</i> populasi spermatozoa pada R1.....	116
Gambar 28	: Gambar hasil analisis <i>flowcytometry</i> sel spermatozoa dengan pewarnaan Fluo-3 A dan Propidium iodium.....	117

Gambar 29	: Gambar hasil analisis <i>flowcytometry</i> konsentrasikalsium intraselulerdalam spermatozoa.....	117
Gambar 30	: Rerata persentase jumlah kalsium intraseluler pada spermatozoa yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	121
Gambar 31	: Rerata persentase fungsionalitas spermatozoa yang terpajan radiasi ponsel secara <i>in vitro</i> selama 1 dan 2 jam	121
Gambar 32	: Gambar mikroskopik spermatozoa manusia dengan ICC ekspresi VGCC sebagai kontrol positif dan pemberian progesteron.....	123
Gambar 33	: Gambar mikroskopik spermatozoa manusia dengan ICC ekspresi VGCC pada pajanan radiasi 2 W/kg selama 1 dan 2 jam.....	124
Gambar 34	: Gambar mikroskopik spermatozoa manusia dengan ICC ekspresi VGCC pada pajanan radiasi 5.7 W/kg selama 1 dan 2 jam.....	124
Gambar 35	: Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai ekspresi VGCC /100 sel pada kondisi <i>in vitro</i> dengan pemeriksaan ICC dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam.....	128

Gambar 36 : Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai ekspresi

VGCC dan Ca intraseluler pada berbagai kelompok..... 128

DAFTAR TABEL

Tabel 1	: Klasifikasi sumber radiasi gelombang elektromagnetik nonpengion.....	16
Tabel 2	: Batasan pajanan radiasi gelombang elektromagnetik ponsel.....	18
Tabel 3	: Hasil uji normalitas data penelitian dengan uji statistik <i>Kolmogorov Smirnov</i>	86
Tabel 4	: Rerata konsentrasi spermatozoa ($\times 10^6/\text{mL}$) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	88
Tabel 5	: Rerata persentase spermatozoa dengan kriteria motilitas <i>slow progressive</i> (B) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	91
Tabel 6	: Rerata persentase spermatozoa dengan kriteria motilitas <i>non-progressive</i> (C) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	94
Tabel 7	: Rerata persentase spermatozoa dengan kriteria motilitas <i>non-motile</i> (D) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	96

Tabel 8	: Rerata persentase spermatozoa dengan morfologi normal yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	99
Tabel 9	: Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi kepala yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	102
Tabel 10	: Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi leher yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	104
Tabel 11	: Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi ekor yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	108
Tabel 12	: Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi sitoplasma yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	110
Tabel 13	: Rerata persentase spermatozoa yang mengalami apoptosis terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	114
Tabel 14	: Rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi <i>in vitro</i>	120
Tabel 15	: Rerata persentase spermatozoa yang mengekspresi VGCC pada setiap 100 sel pada kondisi <i>in vitro</i> dengan	

	pemeriksaan ICC.....	127
Tabel 16	: Hubungan ekspresi GVCC spermatozoa dengan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa pada kondisi <i>in vitro</i>	129
Tabel 17	: Hubungan apoptosis spermatozoa dengan kualitas spermatozoa pada kondisi <i>in vitro</i>	130

DAFTAR SINGKATAN

ABP	: <i>Androgen Binding Protein</i>
ACE	: <i>Angiotensin-converting enzyme</i>
bFGF	: <i>Basic fibroblast growth factor</i>
Ca ²⁺	: <i>Ion Calcium</i>
CaM	: <i>Calmodulin</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosin Mono Phosphat</i>
CatSper	: <i>Cation channel of sperm</i>
CRF	: <i>Corticotropin Releasing Factor</i>
EGF	: <i>Endothelial growth factor</i>
eNOS	: <i>Endothelial Nitrogen Oxide Synthase</i>
FACT	: <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	: <i>Fluorescent isothiocyanate</i>
FS	: <i>Forward Scatter</i>
FSH	: <i>Follicle stimulating hormone</i>
GABA	: <i>Gamma-Amino Butyric Acid</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GOCs	: <i>G-protein Operated Channels</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
ICC	: <i>Immunocytochemistry</i>
ICSH	: <i>Interstitial Cell Stimulating Hormone</i>
LH	: <i>Luteinizing hormone</i>
LVA-CC	: <i>Low-voltage-activated calcium channels</i>
MDA	: <i>Malondyaldehyde</i>
ML	: <i>Medan listrik</i>
MM	: <i>Medan magnet</i>
PE	: <i>Phycocyanin</i>
PI	: <i>Propidium iodide</i>
PKA	: <i>Protein kinase A</i>
PKC	: <i>Protein kinase C</i>
ROC	: <i>Receptor Operated Channels</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SAR	: <i>Specific Absorption Rate</i>
SMOCs	: <i>Second Messenger Operated Channels</i>
SUTET	: <i>Saluran Udara Tegangan Ekstra Tinggi</i>
TRP	: <i>Transient receptor potential channel</i>
VDAC	: <i>Voltage dependent selective anion channel</i>
VGCC	: <i>Voltage-gated Ca²⁺ channels</i>
VOCs	: <i>Voltage Operated Channels</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Hsp	: <i>Heat shock protein</i>
GSM	: <i>Global system for mobile Communications</i>
ICE	: <i>Interleukin 1B converting enzyme</i>

ABSTRAK

PAJANAN RADIASI GELOMBANG ELEKTROMAGNETIKRADIOFREKUENSI TELEPON SELULER TERHADAP KUALITAS DAN FUNGSIONALITAS SPERMATOZOA MANUSIA

**Kajian *in vitro* Konsentrasi, Motilitas, Morfologi, Apoptosis, Kalsium
Intraseluler dan Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* Spermatozoa**

Pendahuluan. Telepon seluler (ponsel) adalah bagian penting dalam kehidupan manusia modern, dan diperlukan penelitian untuk mengevaluasi konsekuensi dari meningkatnya penggunaan *smartphone*.

Tujuan Penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkapkan dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap perubahan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa dan untuk mengetahui mekanisme adanya hambatan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa sebagai perubahan pada tingkat molekuler akibat pajanan radiasi ponsel yang menyebabkan infertilitas pada pria.

Metode. Jenis penelitian adalah Eksperimental laboratorik dengan rancangan *pre-post test controlled group design*. Subyek penelitian adalah spermatozoa manusia dengan kualitas sesuai kriteria WHO (1999). Variabel bebas adalah pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel diukur dengan *electromagnetic radiation detection*, variabel terikat adalah kualitas (konsentrasi, motilitas, morfologi) spermatozoa diperiksa secara konvensional sesuai panduan WHO (1999), dan fungsionalitas spermatozoa berupa apoptosis dan Ca intraseluler dengan *flowcytometry* serta ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) diperiksa secara *immunocytochemistry*. Data hasil pemeriksaan diuji menggunakan analisis *Kruskall-Wallis* dan uji post hoc dengan *Mann Whitney* serta *Pearson correlation test* untuk mengetahui kekuatan hubungan dua variabel.

Hasil. Penelitian ini menyatakan bahwa semakin lama (1 jam dan 2 jam) serta besar pajanan (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg) radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa yaitu konsentrasi spermatozoa ($p < 0.05$), motilitas ($p < 0.05$), morfologi ($p < 0.05$) dan fungsionalitas spermatozoa yaitu apoptosis ($p < 0.05$), jumlah kalsium intraseluler ($p < 0.05$) dibanding kelompok kontrol. Ada hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa dengan kualitas spermatozoa (konsentrasi spermatozoa $p = 0.003$; $r = 0.361$; motilitas $p = 0.000$; $r = 0.664$; motilitas $p = 0.000$, $r = -0.660$; morfologi normal $p = 0.000$; $r = 0.634$; morfologi kelainan ekor $p = 0.008$, $r = -0.324$) dan fungsionalitas spermatozoa (apoptosis $p = 0.039$; $r = 0.257$) setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel.

Simpulan dan Saran. Semakin lama (akut dan kronik) dan besar pajanan (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg) radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas (konsentrasi, motilitas, morfologi) dan

fungsi (apoptosis, jumlah kalsium intraseluler) spermatozoa manusia. Semakin sedikit ekspresi VGCC di dapat berarti semakin sedikit kanal kalsium yang bersifat terbuka, sehingga semakin rendah kualitas dan fungsi spermatozoa. Paparan radiasi ponsel mempengaruhi ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa. Dampak radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dapat dicegah.

Kata kunci : *in vitro*, radiasi ponsel, kualitas, fungsi, ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa.

ABSTRACT

ELECTROMAGNETIC WAVE RADIOFREQUENCY RADIATION EXPOSURE OF CELL PHONE ON QUALITY AND FUNCTIONALITY OF HUMAN SPERMATOZOA

in vitro Studies of the Effects of cell phone on the Concentration, Motility, Morphology, Apoptosis, and Expression of Intracellular Calcium, Voltage- Gated Calcium Channel of Spermatozoa

Background. Cell phone is an essential part of every human modern life, and research is needed to evaluate the consequences of the increasing use of smartphones.

Research Objective. This study aims to reveal the impact of radiofrequency electromagnetic wave radiation exposure of cell phones on the changes the quality and functionalities of spermatozoa and to determine the mechanism of the barriers to the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) spermatozoa as changes at the molecular level due to exposure to cell phone radiation which results in infertility in men.

Research Methodology. The type of this research design is the laboratoric experimental pre - post test controlled group design. The subjects of the research is the quality of sperm according to WHO (1999) criteria. The independent variable was exposure to radiofrequency electromagnetic waves mobile phone radiation measured with an electromagnetic radiation detection. The dependent variable is the quality (concentration, motility, morphology) of spermatozoa conventionally examined according to WHO guidelines (1999), and functionality of spermatozoa in the form of expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) examined by immunocytochemistry and apoptosis and intracellular Ca^{2+} measured with flowcytometry. Data were analyzed using Kruskal Wallis and post hoc with Mann Whitney and Pearson correlation tests.

Results. This study suggests that the longer (1 hour and 2 hours) and large exposures (SAR 2 W / kg and 5.7 W / kg) radiation is electromagnetic wave radiofrequency cell phone, the lower the quality of the sperm is sperm concentration ($p < 0.05$), motility ($p < 0.05$), morphology ($p < 0.05$) and the functionality of spermatozoa that apoptosis ($p < 0.05$), the amount of intracellular calcium ($p < 0.05$) than the control group. There is a relationship between the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) on spermatozoa with the quality of spermatozoa (concentration spermatozoa $p = 0.003$; $r = 0.361$; motility B $p = 0.000$; $r = 0.664$; motility D $p = 0.000$, $r = -0.660$; morphology normal $p = 0.000$; $r = 0.634$; morphological abnormalities tailed $p = 0.008$, $r = -0.324$) and the functionality of spermatozoa (apoptosis $p = 0.039$; $r = 0.257$) following exposure to radiofrequency electromagnetic radiation of cell phones.

Conclusion and Suggestion. The longer (acute and chronic) and large exposures (SAR 2 W / kg and 5.7 W / kg) of cell phone radiofrequency is electromagnetic wave radiation, the lower the quality (concentration, motility, morphology) and functionality (apoptosis, the amount of intracellular calcium) of human

spermatozoa. The less expression in the VGCC can mean less calcium channels that are open, so the lower the quality and functionality of spermatozoa. Exposure to cell phone radiation affects the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) on spermatozoa. The impact of cell phone radiofrequency electromagnetic wave radiation can be prevented.

Keywords : *in vitro*, cell phone radiation, quality, functionality, Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC), human sperm.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Telepon seluler (ponsel) menjadi bagian penting dalam kehidupan modern, baik bagiorang tua, remaja, dan anak-anak. Penggunaan ponsel berlebihan ditambah kemajuan teknologi dan inovasi memberi efek positifbagi masyarakat, sehingga kehidupan menjadi lebih mudah, meskipun menghasilkan polusi elektromagnetik bagi kesehatan manusia (Frank & Jerome, 1980). Polutan yang semakin banyak di masyarakat, seiring dengan berkembangnya disiplin ilmu yang relatif baru yaitu envirogenomik. Envirogenomik merupakan suatu pengetahuan berbasis biologi molekuler yang mempelajari hubungan atau interaksi antara gen dengan lingkungan (Tauhid, 2008), dan mempelajari tentang penyakit berbasis lingkunganyaitu penyakit yang terjadi akibat kondisi lingkungan dan kesehatan (Umar, 2011).

Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel merupakan bagian dari radiasi non-ionisasi.Radiasi non-ionisasi adalah gelombang elektromagnetik berenergi foton sangat rendah, sehingga tidak bisa melakukan proses ionisasi (reaksi antara ion positif dan ion negatif) tetapi bisa melakukan proses eksitasi (berpindahnya elektron dari kulit luar orbitnya) yang terjadi pada sel stabil,sebagai contohnya arus listrik dari Saluran Udara Tegangan Ekstra Tinggi (SUTET), layar monitor komputer, ponsel dan stasiun pemancar radio(Feyyaz *et al*, 2011). Ponsel beroperasi pada frekuensi yang berbeda-beda, sehingga radiasi yang ditimbulkan juga berbeda-beda tergantung intensitas,

frekuensi, lama pajanan, dan sensitivitas jaringan yang terkena. Contohnya ponsel Motorola RazR tahun 2005 dengan SAR radiasi 0.89 W/kg, iPhone dengan SAR radiasi 0.98 W/kg produksi Apple 2007, dan pada tahun 2008 memproduksi iPhone 3G dengan SAR radiasi 1.388 W/kg (Agarwal *et al.*, 2011). Pancaran radiasi gelombang elektromagnetik bersifat melingkar sehingga dalam penggunaan ponsel (terutama di saku celana pada laki-laki) dapat mengenai sistem reproduksi (Agarwal *et al.*, 2011).

Bukti empirik dari penelitian menunjukkan bahwa kasus infertilitas laki-laki (17-25 % pasangan), 50 % disebabkan oleh faktor laki-laki (Agarwal *et al.*, 2011), dan penyebab tersering dihubungkan dengan degradasi lingkungan serta pajanan faktor risiko di tempat kerja. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gelombang elektromagnetik ponsel dapat mengurangi potensi kesuburan laki-laki dengan jenis dan derajat gangguan yang berbeda-beda (Davoudi *et al.*, 2002; Fejes *et al.*, 2005; Erogul *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2007). Di samping itu, kajian *in vivo* menunjukkan kerusakan sel *Leydig*, penurunan diameter tubulus seminiferus, penurunan berat organ testis yang berakibat terjadinya infertilitas (Kavindra *et al.*, 2011), memodulasi sistem imun (Atasoy *et al.*, 2009), menyebabkan sukar tidur, menurunkan fungsi testis dan kadar hormon testoteron (Feyyaz *et al.*, 2011), menurunnya kualitas sperma berupa motilitas sperma (Fejes *et al.*, 2005), viabilitas, dan morfologi, serta demodulasi DNA (dePomerai *et al.*, 2000).

Efek biologis akibat pajanan gelombang elektromagnetik frekuensi rendah antara lain kanker, depresi, tumor otak, leukemia, abortus, kelelahan kronik,

pusing, katarak, gangguan jantung, stres, nausea, dan nyeri dada (Afaf *et al.*,2009), perubahan kualitas dan kuantitas lekosit manusia (Qadrijati, 2002), menghambat perkembangan folikel ovarium pada tahap folikel *de Graaf* dan penurunan jumlah total folikel mencit (Qadrijati& Veronika, 2007), penurunan aktivitas enzim membran seperti *alkaline phosphatase*, *acetylcholinesterase* dan *phosphoglycerate kinase*(Morelli *et al.*,2005; Nylund *et al.*, 2004), serta mempengaruhi memori jangka panjang (Wang & Lai, 2000).

Penelitian ponsel banyak dilakukan terhadap hewan coba secara *in vivo*, tetapi ada kendala teknis berupa waktu penelitiannya lama dan etika. Penelitian *in vivo* antara lain penurunan diameter tubulus seminiferus, penurunan berat organ testis tikus (Kavindra *et al.*, 2011),dan menghambat perkembangan folikel ovarium pada tahap folikel *de Graaf*sertapenurunan jumlah total folikel mencit (Qadrijati&Veronika, 2007). Penelitian epidemiologis juga memiliki keterbatasandalam mengukur pajanan radiasi ponsel pada manusia antara lain 1)Sulit menentukan lama pajanan terkena radiasi ponsel, 2)Besarnya kekuatan radiasi yang berbeda-beda tergantung jenis ponsel dan besar intensitas radiasinya, 3) Sensitivitas atau kondisi biologis individu yang berbeda-beda.

Berdasarkan pertimbangan di atas, peneliti melakukan penelitian dengan menggunakan spesimen spermatozoa manusia secara *in vitro*untuk mengetahui lebih mendalam bagaimana pajanan radiasi ponsel dapat mengganggu kondisi sel spermatozoa terutama melalui membranplasma dan kanal ion kalsium.

Aspek fisik sebagai bagian dari faktor lingkungan terhadap genom bersumber dari radiasi elektromagnetik. Sel secara terus-menerus menerima

berbagai pajanan dari lingkungan sekitarnya harus disikapi dengan respon berupa sintesis beberapa protein tertentu yang memiliki kemampuan khusus, seperti enzim, hormon, faktor pertumbuhan, mediator, sitokin, atau protein transduktor. Faktor epigenetik dalam proses sinyal transduksi berupa 1) Faktor berbasis kimia antara lain, ion, molekul peptida, gugus molekul nonpeptida, molekul steroid, atau molekul gula, lemak, dan protein lain, 2) Faktor berbasis fisikantara lain emisi, radiasi, dan pajanan gelombang elektromagnetik (foton).

Jalur utama penerimaan sinyal dari lingkungan eksternal melalui beberapa faktor perantara terdiri atas protein dan beberapa *second messenger* yang bersifat nonprotein (Tauhid, 2008). Radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel berpengaruh terhadap kesehatan manusia melalui mekanisme utama pada membran plasma, salah satunya melalui *Voltage-Gated Calcium Channels* (VGCC), kemudian baru melalui jalur lainnya yaitu jalur apoptosis, jalur *heat shock protein* (hsp), jalur metabolisme radikal bebas, jalur diferensiasi sel, dan jalur kerusakan DNA.

Peran kanal ion Ca^{2+} dalam mekanisme membran plasma sangat besar, karena ion Ca^{2+} diperlukan sebagai pengaktif reaksi akrosom dan proses kapabilitas (Foresta & Rossato, 1997) serta untuk menginisiasi motilitas sperma (Asmarinah, 2010). Sumber utama Ca^{2+} digunakan untuk mengaktifkan sperma, berada di medium intraseluler, dan mekanisme pengaturan masuknya Ca^{2+} melalui membran plasma memainkan peran penting (Foresta & Rossato, 1997). Mengingat kemampuan peran kanal Ca^{2+} yang sangat besar pada membran plasma

yang berhubungan dengan fertilitas, sehingga perlu diteliti tentang pengaruh radiasi gelombang elektromagnetik ponsel terhadap peran kanal Ca^{2+} .

Kemampuan kanal Ca^{2+} dalam mengatur proses fisiologis sperma, dalam hal membuka atau menutupnya kanal kalsium, dapat dipengaruhi oleh beberapa bahan/zat antara lain :

1) *Thapsigargin* (*inhibitor sarco-endoplasmic reticulum ATP-ase*) yang terdapat dalam spermatozoa manusia, dapat menginduksi pelepasan Ca^{2+} dari penyimpanan internal (Blackmore, 1993; Meizel & Turner, 1993) di dalam reticulum endoplasma sel.

2) *Progesteron* menghasilkan pembukaan kanal yang menyebabkan selektif kation kanal berkurang (Foresta & Rossato, 1997), sehingga dapat menginduksi reaksi akrosom dan motilitas spermatozoa mamalia dan manusia.

3) *Verapamil* sebagai *Calcium channel blockers* sebagai obat antihipertensi bersifat menutup kanal kalsium, sehingga berefek pada penurunan fungsi spermatozoa. Ion kalium menginduksi peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler spermatozoa yang dihambat oleh *prenylamine*, *diltiazem*, *nifedipine*, atau *verapamil*.

Berdasarkan hal-hal di atas, peneliti menggunakan ketiga bahan tersebut di atas sebagai pembanding/kontrol untuk mengetahui lebih dalam bagaimana pajanan radiasi gelombang elektromagnetik ponsel dapat mempengaruhi proses pembukaan atau penutupan kanal ion kalsium sel spermatozoa.

Peran kanal kalsium akibat pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dinilai melalui ekspresi *Voltage-gated Ca^{2+} channel*

(VGCC) yang diperiksa menggunakan metode *immunocytochemistry* (ICC), dan sebagai kontrol, sampel spermatozoa diberi intervensi dengan thapsigargin(menginduksi pelepasan Ca^{2+} dari penyimpanan internal), progesteron (menyebabkan pembukaan kanal ion Ca^{2+}), dan *verapamil* (menyebabkan penutupan kanal ion Ca^{2+}).Hasil ekspresi VGCC didukung dengan data jumlah Ca^{2+} intraseluler spermatozoa yang diperiksa menggunakan *flowcytometry*.Penilaian kualitas sperma menggunakan metode konvensional meliputi konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa. Penilaian fungsionalitas spermatozoa menurut Sharoareet *al.* (2011) adalah keadaan fungsi sperma berupa : perubahan induksi selama kapasitasi, perubahan apoptosis spermatozoa, decondensasi kepala spermatozoa selama fertilisasi, deteksi *stress oksidasi* dan *lipid peroksidase*, serta konsentrasi kalsium intraseluler pada spermatozoa. Pada penelitian ini dibatasi pada fungsi spermatozoa berupa jumlah sel apoptosis dan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler pada spermatozoa manusia menggunakan *flowcytometry*.

Sampai saat ini penelitian tentang pengaruh pajanan radiasi ponsel terhadap sistem reproduksi manusia sebagai regulasi fertilitas belum banyak dilakukan. Beberapa penelitian yang pernah dilakukan antara lain penelitian Ahmad & Baig (2011), Maneesh *et al.* (2009), Davoudiet *al.* (2002) dan Falzone *et al.* (2010). Penelitian *in vitro* secara khusus belum pernah dilakukan pada sistem reproduksi manusia, sehingga menjadi pertimbangan penulis untuk melakukan penelitian ini untuk mengungkapkan bagaimana pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dapat mempengaruhi sistem reproduksi pada tingkat

molekuler berupa perubahan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa, dan bagaimana mekanisme radiasi ponsel dapat mempengaruhi kanal ion Ca^{2+} .

B. Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan titik tangkap pengaruh pajanan radiasi ponsel yang diutarakan di atas, maka untuk mengkaji pengaruh pajanan radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa dan untuk mengkaji bagaimana mekanisme radiasi ponsel dapat mempengaruhi kanal ion Ca^{2+} dapat diajukan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Masalah Utama

- a. Apakah pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel mempengaruhi kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro* ?
- b. Apakah pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel mempengaruhi fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro* ?
- c. Apakah pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel mempengaruhi ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channels* spermatozoa manusia secara *in vitro* ?

2. Submasalah

- a. Bagaimana pengaruh waktu pajanan (akut dan kronik) dan besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*?

- b. Bagaimana pengaruh waktu pajanan (akut dan kronik) dan besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro*?
- c. Bagaimanakah hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* spermatozoa dengan kualitas spermatozoa setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel secara *in vitro*?
- d. Bagaimanakah hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* spermatozoa dengan fungsionalitas spermatozoa setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel secara *in vitro*?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

- a. Untuk mengungkapkan dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*.
- b. Untuk mengungkapkan dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro*.
- c. Untuk mengungkapkan dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channels* spermatozoa manusia secara *in vitro*.

2. Tujuan Khusus

Penelitian *in vitro* ini secara khusus bertujuan untuk :

- a. Menganalisis pengaruh waktu pajanan (akut dan kronik) dan besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponseldengan mengukur kwalitasspermatozoa manusia menggunakan metode konvensional.
- b. Menganalisis pengaruh waktu pajanan (akut dan kronik) dan besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponseldengan mengukur fungsionalitas spermatozoa manusia menggunakan metode *flowcytometry*.
- c. Menganalisis hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* spermatozoa dengan kualitas spermatozoa setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponseldengan menggunakan teknik *immunocytochemistry* (ICC).
- d. Menganalisis hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* spermatozoa dengan fungsionalitas spermatozoa setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponseldengan menggunakan teknik *immunocytochemistry* (ICC).

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, dapat memberikan sumbangan ilmiah di bidang fertilitas terutama mengenai imunopatobiogenesis sistem reproduksi akibat penggunaan ponsel,

khususnya mekanisme peran kanal ion Ca^{2+} terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa.

2. Manfaat praktis

a. Manfaat bagi Masyarakat sebagai Konsumen

Penelitian ini dapat bermanfaat bagi masyarakat/konsumen dengan harapan masyarakat/konsumen dapat melakukan langkah-langkah preventif guna mencegah dampak lebih lanjut dari penggunaan ponsel terhadap kesehatan.

b. Manfaat bagi Industri Ponsel

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada industri ponsel bahwa pajanan radiasi gelombang elektromagnetik ponsel dapat mempengaruhi kesehatan pengguna ponsel, sehingga dapat dilakukan upaya preventif dengan cara memproduksi ponsel dengan *Specific Absorption Rate* (SAR) yang rendah.

c. Manfaat bagi Departemen Kesehatan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan data kepada departemen kesehatan tentang dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dan peran kanal Ca^{2+} spermatozoa sehingga departemen kesehatan dapat mempertimbangkan dalam pengambilan kebijakan yang berhubungan dengan dampak radiasi gelombang elektromagnetik. Hasil

penelitian ini sangat berguna sebagai upaya preventif dalam regulasi fertilitas dalam menanggulangi bahaya radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap ketidaksuburan pada pria.

E.Keaslian Penelitian

Penelitian tentang pajanan radiasi gelombang elektromagnetik paling banyak dihubungkan dengan *reactive oxygen species* (ROS), padahal parameter ROS tidak spesifik karena pengaruh penyakit degeneratif, dan stres juga menyebabkan munculnya ROS. Sepanjang peneliti ketahui, penelitian tentang peran kanal ion Ca^{2+} dalam pajanan radiasi gelombang elektromagnetik ponsel secara kronik, masih sedikit dilakukan.

Penelitian yang berkaitan dengan pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kualitas, fungsionalitas spermatozoa dan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) dipilih karena sepanjang yang peneliti ketahui dan telusuri dari berbagai jurnal penelitian, baik nasional maupun internasional, penelitian tersebut masih jarang dilakukan, dan ada hasil penelitian yang mendukung pengaruh pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap peran ion Ca^{2+} , sedang terhadap *Voltage-Gated Calcium Channels* (VGCC) masih jarang.

Ion Ca^{2+} mempunyai peranan penting dalam mekanisme terjadinya perubahan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa yang sampai sekarang belum banyak diketahui. Penelitian yang berkaitan dengan pengaruh pajanan radiasi

gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa antara lain sebagai berikut :

1. Ahmad & Baig (2011) meneliti pengaruh pajanan ponsel terhadap spermatozoa manusia secara *in vitro*, dengan intervensi berupa pemberian vitamin E. Hasil penelitian pada kelompok terpajan ponsel menunjukkan konsentrasi MDA berkorelasi negatif dengan persentase motilitas sperma dan terjadi peningkatan persentase sperma non-motil. Pemberian suplemen vitamin E memperbaiki motilitas sperma akibat pajanan ponsel.

Penelitian di atas mengaitkan intervensi (pemberian vitamin E) dihubungkan dengan motilitas sperma dan analisis biokimia, sedangkan penelitian yang peneliti lakukan mengaitkan dengan intervensi (pajanan radiasi ponsel) dihubungkan dengan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa. Keduanya sama-sama dilakukan secara *in vitro*.

2. Maneesh *et al.* (2009) meneliti tentang pengaruh pajanan radiasi ponsel dengan stres oksidatif dan penurunan motilitas pada tikus. Hasil penelitian menunjukkan pajanan ponsel selama satu jam pada tikus menyebabkan penurunan persentase sperma motil secara signifikan dan peningkatan peroksida lipid serta penurunan GSH pada testis dan epididimis.

Penelitian di atas mengaitkan intervensi (pajanan radiasi ponsel) dihubungkan dengan motilitas sperma dan analisis biokimia, sedangkan penelitian yang peneliti lakukan mengaitkan dengan intervensi (pajanan radiasi ponsel) dihubungkan dengan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa. Keduanya sama-sama diberi intervensi pajanan radiasi

ponsel, tetapi penelitian di atas dilakukan secara *in vivo* dengan lama pajanan satu jam perhari selama 28 hari dan *in vivo* pada tikus, sedangkan penelitian yang peneliti lakukan secara *in vitro* dengan lama pajanan satu dan dua jam dengan dosis pajanan 2 W/kg dan 5.7 W/kg dan dilakukan pada spermatozoa manusia.

Berdasarkan kedua jenis penelitian di atas maka peneliti mengaitkan antara pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, dengan kualitas serta fungsionalitas spermatozoa manusia dan selain itu juga untuk melihat ekspresi VGCC yang timbul karena intervensi pemberian thapsigargin, progesteron, dan verapamil sebagai kontrol dengan ekspresi VGCC akibat pajanan radiasi ponsel untuk mengetahui pengaruh proses pembukaan atau penutupan kanal ion Ca^{2+} .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Radiasi Gelombang Elektromagnetik Radiofrekuensi Telepon Seluler

Agan penyakit adalah makhluk hidup, zat, bahan, substanti atau kekuatan fisik berpotensi menimbulkan kelainan fisik dan/atau fungsi sebagian tubuh atau seluruhnya serta satu atau lebih organ tubuh manusia. Secara klasik, agan penyakit dikelompokkan dalam tiga kelompok menurut Umar (2011), yaitu 1) Kelompok agan penyakit fisik berupa kebisingan, cahaya ultra violet, dan radiasi nonionisasi, 2) Kelompok bahan kimia toksik berupa pestisida, kadmium, merkuri, CO, Sox,dan Nox, 3) Kelompok mikroorganisme patogen berupa parasit, bakteri, virus, protozoa, dan jamur.

Feyyaz *et al.* (2011) menyebutkan bahwa radiasi elektromagnetik adalah kombinasi medan listrik berosilasi dan medan magnet merambat melalui sebuah ruang (udara) membawa energi dari sebuah sumber ke sekelilingnya. Arus listrik bergerak dengan kecepatan tertentu, terbentuk medan magnet (MM) dan medan listrik (ML) di sekitar elektron bebas di udara. Arus listrik disekitarnya terkena dampaknya, dan terjadi eksitasi (pengeluaran elektron dari kulit luarnya) atau

ionisasi (reaksi ion positif dengan ion negatif). Radiasi gelombang elektromagnetik bersifat melingkar dengan radius yang semakin melebar sehingga dapat berdampak lebih luas areanya (Robert *et al.*, 1999).

Berdasarkan energi dan frekuensinya, gelombang elektromagnetik dapat diklasifikasikan menjadi dua macam menurut Feyyaz *et al.* (2011) dan Umar (2011) :

1) Radiasi Pengion (*Ionizing Radiation*) yaitu gelombang elektromagnetik dengan frekuensi ekstrem tinggi (contohnya sinar X, sinar gamma, Helium-3, dan energi nuklir) sehingga mempunyai energi foton cukup besar untuk melakukan proses ionisasi melalui pemutusan ikatan atom dan berikatan dengan molekul dari sel secara bersama-sama. Radiasi pengion mempunyai dua tipe yaitu tipe elektromagnetik dan tipe partikel. Tipe elektromagnetik adalah energi nonpartikel dengan frekuensi lebih dari $3,0 \times 10^{15}$ Hz, dengan panjang gelombang kurang dari $1,0 \times 10^{-17}$ m dan energi foton (eV) lebih dari $1,2 \times 10^1$. Radiasi partikel terdiri dari partikel alfa, beta, elektron, proton, dan neutron.

2) Radiasi Non-pengion (*Non-Ionizing Radiation*) adalah bagian dari spektrum gelombang elektromagnetik berenergi foton sangat rendah sehingga tidak bisa melakukan proses ionisasi, tetapi bisa memberi efek biologi antara lain melalui pemanasan, reaksi kimia atau induksi arus listrik pada jaringan dan sel melalui proses eksitasi. Berdasarkan energinya, kelompok radiasi non-ionisasi relatif aman daripada radiasi ionisasi, namun demikian dampaknya tergantung pada kekuatan radiasi, lama pajanan, dan kondisi biologis target. Contoh radiasi nonionisasi antara lain radiasi ultraviolet, radiasi *infrared*,

radiofrekuensi, peralatan listrik *microwave*, pengering rambut, TV; kebisingan, suhu panas, layar monitor komputer, SUTET, dan radiasi elektromagnetik radiofrekuensi ponsel. Klasifikasi dan sumber radiasi gelombang elektromagnetik menurut *Scientific Commite On Emerging And Newly Indentified Health Risks-SCENIHR* (2006), dibagi menjadi 4 tipe yaitu *Static*, *Extremely LowFrequency* (ELF), *Intermediate frequency* (IF) dan *Radio frequency* (RF).

Tabel 1. Klasifikasi sumber radiasi gelombang elektromagnetik non-pengion

Tipe	Range frekuensi	Sumber
1. <i>Static</i>	0 Hz	-Alamiah -Video -MRI -Industri elektrolisis
2. <i>Extremely Low Frequency</i> (ELF)	$0 < f < 300 \text{ Hz}$	-SUTET - Mesin listrik di mobil, kereta api dan stasiun -Distribusi domestik
3. <i>Intermediate frequency</i> (IF)	$300 \text{ Hz} < f < 100 \text{ Hz}$	-Monitor - Alat <i>electrosurgery</i> -Komputer -Lampu berfluoresen -Card reader -Alat pendeteksi logam
4. <i>Radio frequency</i> (RF)	$100 \text{ kHz} < f < 300 \text{ GHz}$	-Stasiun televisi, TV -Ponsel -Microwave oven -Radar radio -Personal mobile radio

Sumber : *International Commission on Non-ionizing Radiation Protection* (ICNIRP), EduMed 2010.

Gelombang elektromagnetik radiofrekuensi mempunyai dua komponen yaitu medan listrik dan medan magnet maka pengukuran besarnya radiasi pada suatu benda dapat dilakukan dengan mengukur kekuatan medan listrik (volts per meter =V/m) dan kekuatan medan magnet (ampere per meter = A/m) dengan alat ELF survei meter (Robert *et al*, 1999).Dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap tubuh manusia diukur menggunakan unit standarisasi yaitu nilai SAR (*Specific Absorption Rate*). SAR adalah sebuah ukuran rata-rata energi radiofrekuensi yang diabsorpsi tubuh dengan satuan Watt/kg (Agarwal&Hamada, 2012). Alat spesifik tes SAR dihubungkan dengan alat transmisi *wireless* pada tingkatan kekuatan tertinggi pada semua frekuensi tes. Nilai SAR tergantung pada kedekatan terhadap sel, kedekatan penggunaan ponsel terhadap tubuh saat digunakan, model penggunaan alat (model berbicara atau *standby*), dan penggunaan alat *hand-free* (*Bluetooth*).

Medan listrik dan medan magnet dapat menginduksi masuk kesel tubuh. Perubahan kekuatan dan efek langsung alat listrik terhadap tubuh manusia, melalui permitivitas dan konduktivitas. Sel tubuh manusia terdiri dari air dan ion, ketika jaringan terpajan radiasi gelombang elektromagnetik, maka molekul dielektrik (*dipole*) mengalami polarisasi (permitivitas), dan konduktivitas (densitas konduksi arus listrik yang dihasilkan karena pemberian pajanan). Kandungan air yang tinggi pada tubuh manusia menyebabkan tubuh kekurangan konduktor medan listrik. Aplikasi medan magnet mudah menstranmisikan melalui tubuh manusia disebut permeabilitas (Agarwal &Hamada, 2012).

Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik mempunyai batasan-batasan yang berbeda-beda tergantung frekuensi dan panjang gelombangnya. Untuk melindungi masyarakat dari pajanan radiasi gelombang elektromagnetik, *International Commission on Nonionizing Radiation Protection* (ICNIRP) mengeluarkan pembatasan maksimal pajanan ponsel di Amerika dan Eropa sebesar 1.6 Watts/kg dan 2.0 Watts/kg. Sedangkan standar emisi *microwave* berdasarkan *Food and Drug Administration* (FDA) yang diperkenankan minimal 1 mW/cm² dan maksimal 5mW/cm². *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) bertanggung jawab terhadap perlindungan pekerja dari pajanan radiasi gelombang elektromagnetik pada frekuensi 10 MHz sampai 100 GHz, pekerja tidak boleh melebihi *power density* 10 mW/cm² (EduMed, 2010). Besarnya pajanan yang diperbolehkan menurut ICNIRP terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Batasan pajanan radiasi gelombang elektromagnetik ponsel

Sistem	Frekuensi (MHz)	Medan listrik(V/m)	Medan magnet (μT)	Medan magnet (Watt/kg)
UHF TV	407-806	29.8	0.099	2.0
800 MHz	806-869	40.0	0.13	4.3
	824-894	40.6	0.14	4.4
900 MHz	890-960	41.0	0.14	4.5
1800 MHz	1710-1880	56.9	0.19	8.6

Sumber : *International Commission on Nonionizing Radiation Protection* (ICNIRP), EduMed 2010.

Pengaruh radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kesehatan menjadi perdebatan di kalangan ilmuwan. Radiasi *microwave* berefek pada sistem biologi manusia melalui peningkatan panas di jaringan, sebagai efek termal. Mekanisme pajanan radiasi gelombang elektromagnetik

radiofrekuensi terhadap tubuh manusia melalui dua mekanisme yaitu secara langsung dan secara tidak langsung (Achmadi, 2011) :

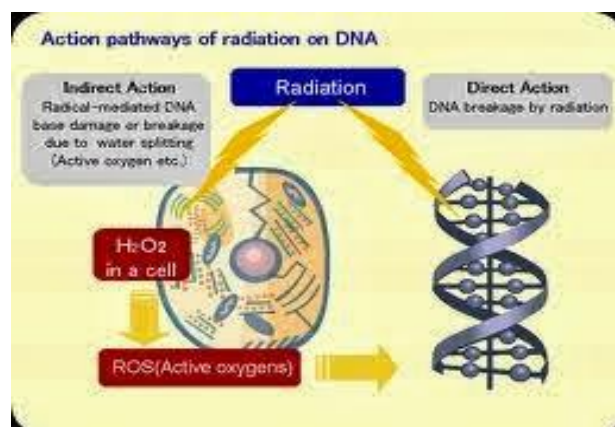
1. Mekanisme secara tidak langsung

Setiap organ tubuh tersusun atas jaringan yang merupakan kumpulan sel yang mempunyai fungsi dan struktur yang sama. Sel sebagai unit fungsional terkecil dari tubuh dapat menjalankan fungsi hidup secara lengkap dan sempurna seperti pembelahan, pernafasan, dan pertumbuhan. Sel terdiri dari dua komponen utama, yaitu sitoplasma dan inti sel (*nucleus*). Sitoplasma mengandung sejumlah organel sel yang berfungsi mengatur berbagai fungsi metabolisme penting sel. Inti sel mengandung struktur biologik yang sangat kompleks yang disebut kromosom yang mempunyai peranan penting sebagai tempat penyimpanan semua informasi genetika yang berhubungan dengan keturunan atau karakteristik dasar manusia. Kromosom manusia yang berjumlah 23 pasang mengandung ribuan gen yang merupakan suatu rantai pendek dari DNA (*Deoxyribonucleic acid*) yang membawa suatu kode informasi tertentu dan spesifik.

Interaksi radiasi non-pengion dengan materi biologik diawali dengan interaksi fisika yaitu, proses eksitasi yaitu berpindahnya elektron dari kulit yang satu ke kulit luarnya. Apabila proses eksitasi ini berjalan terus menerus (secara kronik) maka akhirnya akan terjadi juga proses ionisasi meskipun memerlukan waktu yang lama. Interaksi terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung bila penyerapan energi langsung terjadi pada molekul organik dalam sel yang mempunyai arti penting, seperti DNA. Interaksi secara tidak langsung bila terlebih dahulu terjadi interaksi radiasi dengan molekul air dalam sel yang efeknya

kemudian akan mengenai molekul organik penting. Mengingat sekitar 80% dari tubuh manusia terdiri dari air, maka sebagian besar interaksi radiasi dalam tubuh terjadi secara tidak langsung.

Penyerapan energi radiasi non-pengion oleh molekul air dalam proses radiolisis air menghasilkan radikal bebas (H^* dan OH^*) yang tidak stabil serta sangat reaktif dan toksik terhadap molekul tubuh. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul dengan sebuah elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Keadaan ini menyebabkan radikal bebas menjadi tidak stabil, sangat reaktif dan toksik terhadap molekul tubuh. Radikal bebas yang terbentuk dapat bereaksi menghasilkan suatu molekul biologik peroksida (H_2O_2) yang lebih stabil dan dapat berdifusi lebih jauh dari tempat pembentukannya sehingga lebih besar peluangnya dibandingkan radikal bebas untuk menimbulkan kerusakan biokimiawi pada molekul biologi. Perubahan fungsi atau kematian dari sejumlah sel menghasilkan suatu efek biologik dari radiasi yang bergantung pada jenis radiasi, dosis, jenis selnya (Achmadi, 2011).



Gambar 1. Mekanisme radiasi mengenai DNA sel (Achmadi, 2011)

Keterangan : Mekanisme radiasi non-pengion mempengaruhi DNA sel melalui jalur langsung dan tidak langsung.

2. Mekanisme secara langsung

Interaksi radiasi dengan DNA dapat menyebabkan terjadinya perubahan struktur molekul gula atau basa, putusnya ikatan hydrogen antar basa, hilangnya basa dan lainnya. Kerusakan yang lebih parah adalah putusnya salah satu untai DNA yang disebut *single strand break*, atau putusnya kedua untai DNA yang disebut *double strand breaks*. Sel yang paling sensitif terhadap pengaruh radiasi adalah sel yang paling aktif melakukan pembelahan dan tingkat differensiasi (perkembangan/ kematangan sel) rendah. Sedangkan sel yang tidak mudah rusak akibat pengaruh radiasi adalah sel dengan tingkat differensiasi yang tinggi (Achmadi, 2011).

Penelitian tentang radiasi elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dapat menurunkan potensi fertilisasi pada laki-laki merupakan hal penting, karena laki-laki umumnya meletakkan ponselnya di saku dekat sabuk (Agarwalet *al.*, 2009). Penelitian Qadrijati & Farah (2007) menunjukkan bahwa pajanan radiasi gelombang elektromagnetik frekuensi ekstrem rendah menghambat perkembangan folikel ovarium tahap folikel *de Graaf* dan jumlah total folikel mencit secara signifikan, sedangkan terhadap kuantitas leukosit ternyata sangat berpengaruh (Qadrijati & Veronika, 2007). Feyyaz *et al.*, (2011), radiasi gelombang elektromagnetik dapat memodulasi sistem imun melalui stres fisik yang disebabkan pajanan radiasi ponsel menyebabkan perubahan gangguan fungsi sistem saraf otonom yang berhubungan dengan kelenjar adrenal. Dalam kondisi

ini sistem saraf otonom akan mempengaruhi kinerja sistem hormonal yang dapat merangsang aktivitas hipotalamus dan *Corticotrophin releasing factor* (CRF) yang berhubungan dengan hipofisis anterior serta *adrenocortitrophin hormone* (ACTH). Dalam keadaan ini dihasilkan hormon adrenalin yang berlebihan sehingga mempengaruhi dan mengganggu kerja sistem homeostasis tubuh. Radiasi ponsel juga menyebabkan gangguan tidur, menurunkan fungsi testis sehingga menurunkan kadar testosteron laki-laki, kapasitas fungsi sel mononuklear darah tepi menurun melalui perubahan kemampuan adhesi. Hal ini sebagai tanda bahwa terjadi modulasi sistem imun (Atasoy *et al.*, 2009).

Ozguner *et al.* (2006); Feyyaz *et al.* (2011), menunjukkan bahwa pajanan gelombang elektromagnetik pada tikus memberi efek signifikan menurunkan kadar total testosteron serum, LH plasma, dan kadar FSH. Proliferasi sel dan diferensiasi berupa apoptosis (Tian *et al.*, 2002), sintesis DNA dan transkripsi RNA (Takashi *et al.*, 1986), sintesis ATP (Zyrmec *et al.* 2002), produksi hormon (Paksy *et al.*, 2000), sistem enzim antioksidan (Kula *et al.*, 2000), aktivitas metabolik (Milani *et al.*, 2001), NFkB dan destruksi sel (Wolf *et al.*, 2005).

Beberapa hal yang dapat dilakukan untuk promotif dan preventif individu dari pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel antara lain

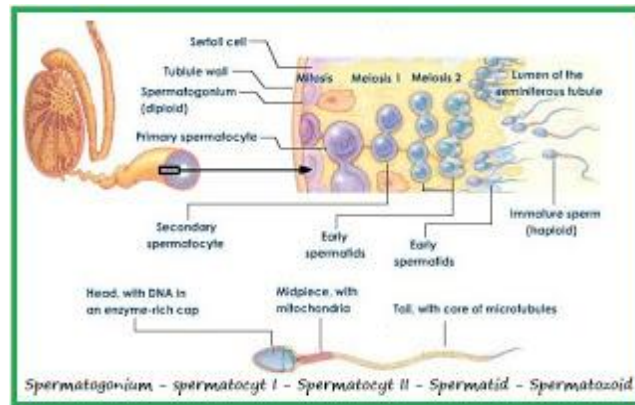
1. Pemberian 1,25(OH) D atau vitamin D dan Vitamin E dapat meningkatkan kadar Ca^{2+} intrasel, motilitas sperma, dan menginduksi reaksi akrosom pada spermatozoa matang (Ahmad & Baiq, 2011).
2. Pemberian diet sayuran, biji-bijian dan buah-buahan yang mengandung antioksidan dan diet protein tinggi, diet rendah lemak.

3. Pemberian terapi sinvastatin sebagai pencegah peroksida lipid.
4. Menjauhkan dari sumber radiasi dengan memperhatikan : jarak, lama terpajan radiasi, serta penggunaan pelindung.
5. Menjauhkan diri dari sumber radiasi ponsel bagi orang yang rentan seperti ibuhamil dan anak-anak.
6. Olahraga teratur akan membantu mengurangi stres
7. Tidak merokok dan minum alkohol.
8. Mengonsumsi suplemen alami dan vitamin yang dapat meningkatkan jumlah sperma yang mengandung antioksidan antara lain : vitamin C, E, B kompleks, Selenium, Zinc, asam folat, carnitine.
9. Mengubah cara membawa ponsel, tidak diletakkan dalam saku celana (dekat sistem reproduksi)pada pria.
10. Mengganti ponsel dengan jenis ponsel yang SAR lebih rendah.

B. Anatomi Sistem Reproduksi Laki-laki

Organ seks primer pria adalah dua buah testis terbungkus skrotum dan di luar rongga tubuh, tempat testis dipertahankan tetap dingin supaya berfungsi dengan baik. Setiap testis terbentuk dari 200 tubulus seminiferus saling melilit erat dalam kompartemen fibrosa berisi spermatozoa (Guyton & Hall, 2006), sedangkan organ seks sekunder pria terdiri dari 1) Kelenjar bulbouretra (kelenjar *cowper*) dan kelenjar uretra (kelenjar *littre*), berfungsi membasahi bagian pangkal uretra, 2) Kelenjar prostat, mensekresi cairan alkali berisi asam sitrat, kalsium, asam fosfat, enzim pembekuan dan fibrinolisin berfungsi meningkatkan

pergerakan sperma dan fertilisasi sperma, 3) Epididimis, saluran epididimis dan *vas deferens*, berfungsi untuk pematangan spermatozoa dan penyimpanan spermatozoa matang serta berfungsi dalam transpor spermatozoa, 4) Vesika seminalis, mensekresi fruktosa, asam askorbat, inositol, ergotionein, asam amino, prostaglandin yang bermanfaat bagi nutrisi sperma.



Gambar 2.Spermatogenesis (Leblond & Clermount, 1972)

Keterangan : Proses pembentukan spermatozoa mulai dari spermatogonium sampai spermatozoid.

1. Spermatogenesis dan Spermiogenesis

Spermatogenesis adalah proses perkembangan sel spermatogonium dari epitel seminiferus berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi spermatozoa bebas (Leblond & Clermount, 1972). Tahap pertama adalah tahap poliferasi (pembelahan mitosis) sel spermatogonia membentuk spermatosit primer. Tahap kedua adalah pembentukan spermatid dari spermatosit primer melalui pembelahan reduksi, sedangkan tahap ketiga adalah pembentukan spermatozoa dari spermatid melalui proses spermiogenesis (Guyton & Hall, 2006).

Spermatogenesis merupakan proses yang kompleks dimulai dari proliferasi sel germinal dan pematangan spermatogonia menjadi spermatozoa.

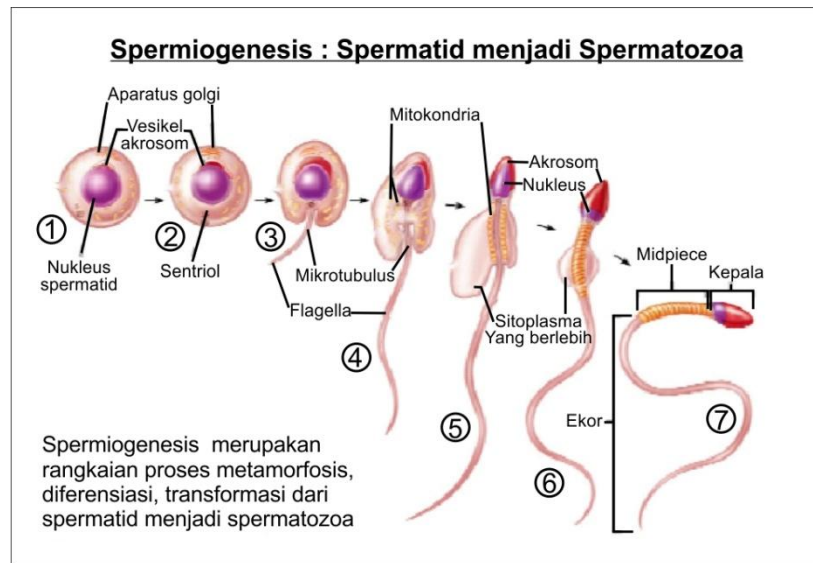
Selama spermatogenesis, kematian sel secara terprogram (apoptosis) memainkan peran penting untuk menghilangkan sel-sel germinal yang cacat atau yang membawa mutasi DNA. Pada proses fisiologi ini dapat terjadi disregulasi sehingga apoptosis sel germinal dapat menyebabkan infertilitas pria. Apoptosis sel germinal juga bisa dihasilkan dari gangguan eksternal seperti perubahan hormonal, atau paparan bahan kimia beracun atau radiasi yang dapat menyebabkan penurunan jumlah sperma dan masalah kesuburan pria (Pentikäinen,2002).

Selama proses spermatogenesis terjadi proses apoptosis yang diatur oleh ekspresi gen p53, p21, caspase, bcl-2 dan Fas (Said *et al.*, 2004). Infertilitas pria menunjukkan korelasi positif dengan jumlah sperma yang mengalami apoptosis (Wlodkowicz *et al.*, 2012), peningkatan jumlah apoptosis karena terikutnya sperma yang belum matang ketika ejakulasi (Cayli *et al.*,2004; Shaha, 2007). *Caspases* (CP, *cysteiny-l-aspartate-specific proteases*) sebagai transducer utama dan efektor bagi sinyal apoptosis yang mempengaruhi program kematian sel (Grunewald *et al.*, 2007). Setiap deregulasi proses apoptosis selama spermatogenesis mengarah pada pembentukan sperma yang rusak. Testis mempunyai fungsi penting pada spermatogenesis dan steroidogenesis. Sel-sel Leydig mengeluarkan testosteron yang berperan dalam regulasi merangsang dan memelihara produksi sperma. Kelenjar pituitari mengatur reproduksi pria melalui produksi *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH). LH merangsang sel-sel Leydig untuk menghasilkan testosteron.

Dampak radiasi ponsel pada steroidogenesis testis sehingga mempengaruhi sel-sel Leydig dan hipofisis kelenjar. Wdowiak *et al.* (2007) menyebutkan bahwa sel-sel Leydig adalah salah satu sel yang paling rentan terhadap pajanan radiasi ponsel dan cedera sel-sel Leydigi ini mempengaruhi spermatogenesis secara *in vivo*.

Pada hipofisis anterior terjadi penghambatan FSH berlebihan dan pelepasan LH dalam mengimbangi hormon testosteron yang rendah. Tidak ada perbedaan serum testosteron dikaitkan dengan perubahan reseptor testosteron atau peningkatan stres oksidatif pada aksesori kelenjar pria (Salama *et al.*, 2009). Namun, tergantung juga durasi pajanan radiasi ponsel. Pada pajanan radiasi tingkat tinggi (200kV/m) terjadi perubahan chromatin (Fang *et al.*, 2010) sehingga menyebabkan kerusakan sel yang besar.

Spermiogenesis ialah proses perkembangan spermatid menjadi spermatozoa dewasa setelah melalui beberapa tahap perkembangan spermatid. Rangkaian perubahan dalam spermiogenesis melalui beberapa fase yaitu pada fase golgi, fase cap (tudung), fase akrosom, dan fase pematangan (Guyton & Hall, 2006).



Gambar 3. Spermiogenesis (Guyton & Hall, 2006)

Keterangan : Proses pembentukan spermatid menjadi spermatozoa

Proses spermatogenesis tergantung kesempurnaan kerja hormon hipotalamus dalam mensekresikan GnRH (*Gonadotropin ReleasingHormone*) dan hormon seks steroid melalui mekanisme umpan balik(Tjay& Kirana, 2002). GnRH merangsang hipofisis menghasilkan dua jenis gonadotropin, yaitu hormon pemicu folikel (FSH = *follicle stimulating hormone*) dan *luteinizing hormon* (LH). LH pada pria disebut *Interstitial Cell Stimulating Hormone* (ICSH), LH merangsang sel *Leydig* untuk mensintesis dan mensekresi hormon yang memodulasi fungsi tubulus (seperti hormon *beta-endorphin*, *oxcytocin*), sedangkan FSH pria bertanggung jawab perkembangan testis dan menjamin spermatogenesis dengan mempertahankan fungsi tubulus seminiferus. FSH berfungsi merangsang sel sertoli mensintesis ABP (*Androgen BindingProtein*) dan inhibin, membuat sel *Leydig* lebih peka terhadap LH sehingga hormon testosteron dihasilkan untuk proses spermatogenesis melalui tahap perkembangannya sampai

terbentuk spermatozoa dewasa. ABP dihasilkan sel sertoli dibawah pengontrolan FSH, berfungsi sebagai alat pengangkut androgen dari jaringan interstisial ke epitel germinal, merupakan salah satu cara FSH untuk meningkatkan aktivitas androgen terhadap spermatogenesis. ABP dalam cairan testis mempercepat pengangkutan androgen dari testis ke epididimis. Androgen diperlukan pada proses pematangan spermatozoa (pematangan fisiologik) selama perjalanannya dalam saluran epididimis dan berperan dalam melakukan fungsi epididimis (Guyton& Hall, 2006).

Spermatozoa di tubulus seminiferus, bergerak ke epididimis, tetapi spermatozoa belum memiliki kemampuan fungsional, yaitu mempunyai kemampuan gerak dan fertilisasi. Baru setelah di dalam epididimis 18 jam sampai 10 hari, spermatozoa mengalami pematangan atau maturasi berlangsung perlahan dan bertahap sejak mulai dari kaput, korda dan kauda epididimis. Epididimis mensekresi banyak cairan berupa hormon, enzim, dan zat khusus untuk pematangan spermatozoa, sehingga spermatozoa menjadi fungsional (Soeradi, 1990).

Hormon seks steroid melalui mekanisme umpan balik juga mempengaruhi produksi LHRH dan GnRH. Menurut Dufau *et. al.* (1993), *Corticotropin Releasing Factor* (CRF) adalah neuropeptida kunci pada jalur stres, mempunyai aksi penghambatan besar terhadap fungsi testis dikenal sebagai efek anti reproduksi tingkat sentral (penghambatan pada perilaku seksual dan sekresi LH). CRF mempengaruhi sel *Leydig* testis dan aktif melalui reseptor afinitas tinggi pada membran sel *Leydig*. CRF juga sebagai regulator negatif yang poten pada

aksi LH, penghambatan gonadotropin-induksi generasi cAMP dan produksi androgen. CRF juga sebagai stimulus primer mensekresi *betha-endorphin* sel *Leydig*, melalui penghambatan parakrin aksi FSH di kompartemen tubulus testis melalui reseptor afinitas tinggi sel sertoli. Penghambatan aksi CRF sel *Leydig* melalui *protein kinase C* pada tingkat subunit *catalytic adenyl cyclase*. Sekresi hormon CRF dikontrol sel *Leydig* melalui LH, dengan melibatkan serotonin (5HT), serotonin agonis dan aktivasi autokrin reseptor 5HT2 dalam melepaskan CRF dari sel *Leydig* serta efeknya menginduksi hCG pada generasi cAMP dan *steroidogenesis* melalui hidrolisis *phosphoinositide* (Tinajero *et al.*,1992).

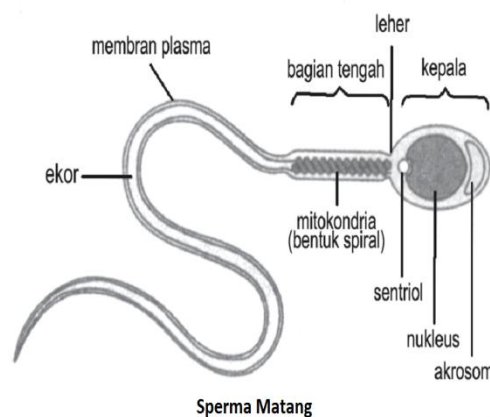
Dufauet *al.* (1993), menyebutkan bahwa aktivasi dan pengaturan fungsi sel *Leydig* berupa sekresi testosteron dan interaksi dengan reseptor membran, dipengaruhi oleh LH membentuk sistem neuroendokrin. Menurut Nieschlag & Behre (1990), hormon peptida ini penting mengontrol proses seluler sel target meliputi aliran ion, aktivitas enzim, sintesis RNA dan protein, sintesis dan sekresi steroid, pembelahan sel, motilitas sel serta komunikasi antar sel.

Androgen berfungsi untuk mempertahankan fungsi testis, vesikula seminalis, prostat, dan mempertahankan ciri kelamin sekunder serta kemampuan seksual, dibutuhkan untuk spermatogenesis serta pematangan sperma secara biologis (Mycek *et al.*, 2001). Perangsangan jalur androgen melalui mekanisme cAMP-mediated, perangsangan mempengaruhi secara negatif oleh aksi hormon peptida melalui *guanyl nucleotide inhibitory subunit adenylate cyclase*. Semacam aksi penghambatan angiotensin dimana merupakan hal penting pada jalur cAMP sel *Leydig*. Hormon memfasilitasi produksi androgen oleh mekanisme cAMP-

independent pada membran plasma atau intraseluler. Sistem Ca^{2+} *sensitive kinase* terdapat pada membran sel *Leydig*. Reseptor LH difosforilasi oleh *cAMP-dependent protein kinase*, sehinggajadidimerisasi reseptor dan agregasi sinyal tranduksi serta fosforilasi reseptor oleh satu atau lebih kinase termasuk dalam regulasi aksi gonadotropin. Aktivasi *Adenylate cyclase* dipengaruhi Ca^{2+} . Fosforilasi membran memodifikasi LH merangsang aktivitas *adenylate cyclase* dan menginduksi aksi LH pada aktivasi membran sel *Leydig* (Dufauet *al.*, 1993).

2. Struktur Spermatozoa Manusia

Spermatozoa memiliki struktur yang khusus, secara umum dibagi menjadi tiga bagian, yakni kepala, bagian tengah sperma dan ekor sperma.



Gambar 4. Struktur spermatozoa manusia (WHO, 1999)

Keterangan : Bagian- bagian dari spermatozoa matang pada manusia (kepala, leher, ekor).

Struktur spermatozoa tersebut terlihat mempunyai bentuk mirip kecebong (anak katak yang baru menetas). Struktur spermatozoa manusia dapat dijelaskan

sebagai berikut a) Kepala spermatozoa terdapat inti sel. Bagian kepala dilengkapi dengan bagian yang disebut dengan akrosom, yaitu bagian ujung kepala spermatozoa yang berbentuk agak runcing dan menghasilkan enzim hialuronidase berfungsi untuk menembus dinding sel telur. Pada bagian kepala terdapat 22 kromosom tubuh dan 1 kromosom kelamin yaitu kromosom X atau Y, kromosom X untuk membentuk bayi berkelamin perempuan, sedangkan kromosom Y untuk membentuk bayi berkelamin laki-laki. Kromosom kelamin laki-laki ini yang nantinya akan menentukan jenis kelamin pada seorang bayi.

Morfologi spermatozoa dikatakan normal apabila memiliki kepala berbentuk oval dengan kontur biasa (panjang 4,0-5,0 μm dan lebar 2,5-3,5 μm) dengan bagian anterior pucat (akrosom, 40-70% dari daerah kepala) dan gelap di daerah posterior. Rasio panjang-lebar kepala harus 1,50-1,75. Ekor sperma simetris terletak di dasar kepala, hanya satu ekor (panjang sekitar 45 μm), tidak melingkar, sobek atau membungkuk di atas dirinya sendiri. Bagian belakang kepala bagian pertama dari ekor, pertengahan harus agak lebih tebal (maksimal ketebalannya = 1 μm) dan panjang sekitar 7-8 μm . Sitoplasma memiliki garis halus (tidak teratur), muncul di dasar kepala dan ukurannya kurang dari 1/3 dari kepala sperma normal (WHO, 1999).

Kelainan morfologi spermatozoa pada kepala antara lain besar, kecil, meruncing (yaitu rasio panjang-lebar >2), berbentuk buah pir (pyriform), bulat, amorf, vakuolisasi terutama ($> 20\%$ dari daerah kepala adalah vakuola yang tidak terwarnai), daerah akrosom kecil ($<40\%$ dari kepala area), kepala ganda, *Pin head* atau kepala mikrospermatozoa tidak dihitung (WHO, 1999), b) Bagian tengah

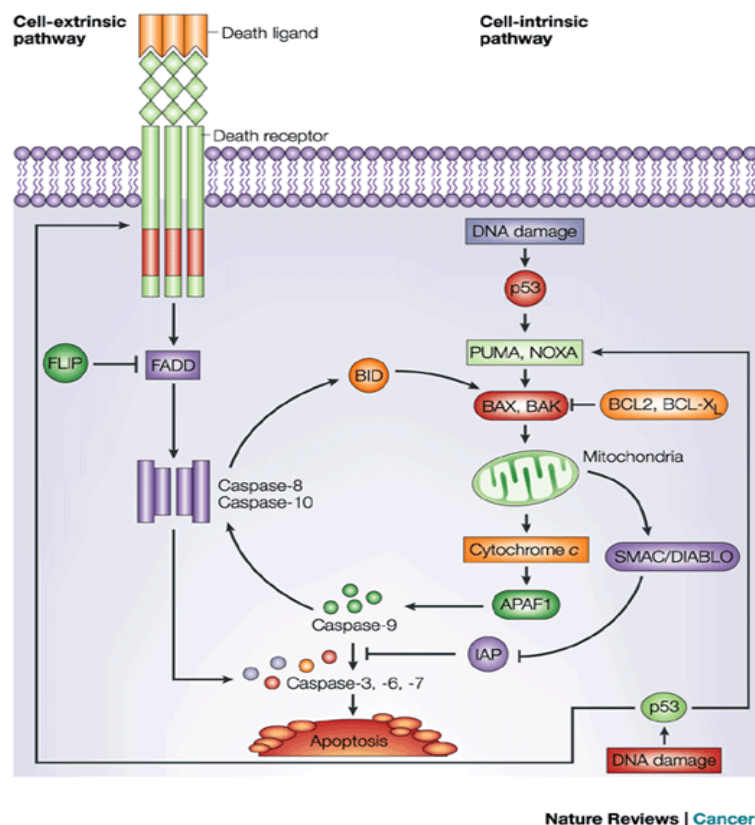
spermatozoa mengandung mitokondria yang berfungsi untuk pembentukan energi. Energi tersebut berfungsi untuk pergerakan dan kehidupan sel sperma. Bahan bakar dalam pembentukan energi ini adalah fruktosa. Kelainan morfologi spermatozoa pada leher antara lain : ekor bengkok (*midpiece* dan ekor membentuk sudut $> 90^\circ$ dengan sumbu panjang kepala sperma) merupakan pertumbuhan dari sentriol yang salah), ekor asimetris, tebal atau tidak teratur *midpiece* (tidak adanya atau perpindahan selubung mitochondrial) atau kombinasi dari abnormalitas lainnya (WHO, 1999), c) Ekor spermatozoa lebih panjang, bersifat motil atau banyak bergerak. Fungsinya adalah untuk alat pergerakan sperma sehingga dapat mencapai sel telur. Pergerakan sel ini maju didorong oleh bagian ekor dengan pergerakan menyerupai sirip belakang ikan. Kelainan morfologi spermatozoa pada ekor antara lain pendek, ganda (*multiple*), jepit rambut, patah, membungkuk (sudut $> 90^\circ$), lebar tidak teratur, atau ekor digulung atau kombinasi dari kelainan lainnya. Ekor bebas/lepas tidak dihitung. Jumlah ekor melingkar tinggi dapat menunjukkan bahwa spermatozoa telah mengalami stres hipoosmotik. Ekor melingkar juga terkait dengan penuaan sperma (WHO, 1999).

Pembentukan spermatozoa dipengaruhi oleh hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Lutenizing Hormone*). Pembentukan FSH dan LH dikendalikan oleh hormon gonadotropin yaitu hormon yang disekresikan oleh kelenjar hipotalamus dari otak. Proses spermatogenesis juga dibantu oleh hormon testosteron. Sperma yang sudah terbentuk di dalam testis seperti pada proses di atas, kemudian akan disalurkan ke bagian epididimis dan kemudian ke

vas deferens, dan bercampur dengan sekret dari kelenjar prostat dan *cowper* kemudian dikeluarkan melalui uretra yang terdapat di dalam penis.

3. Apoptosis

Apoptosis ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimiawi khas akibat inisiasi oleh stimuli fisiologis maupun patologis (Shunet *al.*, 2002). Perubahan bervariasi tergantung pada jenis sel, mekanisme induksi apoptosis, dan waktu di mana proses apoptosis dianalisis (Wlodkowic *et al.*, 2012). Proses apoptosis membutuhkan waktu lebih lama dibandingkan dengan nekrosis yaitu sekitar beberapa jam hingga beberapa hari tergantung inisiatornya (Willingham, 1999).



Gambar 5. Mekanisme apoptosis

(Sumber: <http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n6/images/nrc821-i1.gif>)

Keterangan : Mekanisme apoptosis melalui jalur Mitokondria dan jalur *Death Reseptor*

Mekanisme apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan instrinsik sel yaitu jalur Mitokondria (*cellular stress*) dan jalur *Death Reseptor*. Sel selain mengalami nekrosis, juga dapat mengalami kematian yang terencana melalui jalur apoptosis. Sel yang akan mengalami apoptosis mengaktifasi enzim yang berfungsi untuk mendegradasi DNA nuklear sel itu sendiri, protein sitoplasma serta nukleus itu sendiri. Berbeda dengan nekrosis, pada apoptosis membran sel tetap intak. Hanya saja, tetap terjadi perubahan membran sehingga akan dikenali oleh fagosit untuk fagositosis. Sel yang mati akan dibersihkan tanpa mengalami kebocoran. Dengan begitu, tidak ada reaksi inflamasi yang terbentuk pada proses apoptosis. Apoptosis dan nekrosis sebenarnya dapat terjadi secara bersamaan. Selain itu, apoptosis juga dapat diinduksi oleh proses patologis. Program bunuh diri sel ini berguna untuk menghindarkan tumbuhnya sel-sel yang berpotensi bahaya serta yang membersihkan sel-sel yang sudah tidak berguna. Juga, untuk membersihkan sel-sel yang tidak dapat diperbaiki kerusakan pada protein atau DNA sel setelah mengalami proses patologis.

Dasar terjadi apoptosis adalah teraktivasinya kaspase. Aktivasi enzim ini dapat mengaktifasi nuklease sehingga terjadi degradasi DNA dan enzim lain yang akan menghancurkan nukleoprotein dan protein sitoskeletal. Aktivasi kaspase ini terpengaruh oleh keseimbangan jalur molekular yang pro dan anti apoptosis. Terdapat dua jalur utama terjadi apoptosis yaitu, jalur mitokondria dan jalur kematian reseptor.

a. Jalur Mitokondria

Beberapa protein di dalam mitokondria memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis, di antaranya adalah sitokrom c dan antagonis endogenous cytosolic inhibitor apoptosis. Sel dapat menentukan untuk tetap dipertahankan atau mengalami apoptosis tergantung pada permeabilitas mitokondria. Kondisi tersebut ditentukan oleh sekumpulan lebih dari 20 protein seperti famili Bcl-2. Sekelompok reseptor akan teraktivasi ketika sel mengalami kondisi seperti kekurangan faktor pertumbuhan dan hormon tropik atau terekspos dengan agen yang menyebabkan kerusakan DNA, atau mengakumulasi banyak protein yang salah terbentuk. Sensor-sensor tersebut merupakan bagian dari famili Bcl-2, yaitu Bax dan Bak. Sementara itu, yang anti apoptosis adalah anti-apoptotic molecule Bcl-2 dan Bcl-x_L. Pada saat akan terjadi apoptosis, kedua molekul tersebut dihambat. Nantinya akan terjadi kebocoran protein mitokondria. Sitokrom c bersama dengan beberapa kofaktor berikatan dengan Apaf-1 membentuk *procaspase-9* kemudian menghasilkan *apoptosome* yaitu *caspase-9* yang aktif. *Apoptosome caspase-8* dan *caspase-9* bertemu mengaktifkan *caspase-3, -6-7* dan bertemu dengan kunci substrat pembelahan sehingga menyebabkan terjadinya apoptosis. Teraktivasinya kaskade kaspase ini akan menyebabkan fragmentasi nuklear. Jika sel terkekspos oleh faktor pertumbuhan dan sinyal survival lainnya, sel akan melakukan sintesis famili Bcl-2 yang berfungsi sebagai antiapoptosis, yaitu Bcl-2 dan Bcl-x_L. Sementara sel yang kekurangan faktor pertumbuhan akan mengaktifkan Bax dan Bak serta mengurangi Bcl-2 dan Bcl-x_L.

b. Jalur Kematian Reseptor

Jalur ini seringkali digunakan untuk mengeliminasi limfosit yang reaktif terhadap diri sendiri serta membunuh sel yang menjadu target sel limfosit T sitotoksik. Sel memiliki molekul permukaan yang dapat memicu apoptosis yang disebut *death reseptor*. Kebanyakan dari reseptor tersebut adalah bagian dari TNF (*tumor necrosis factor*). Prototipe dari reseptor kematian ini adalah reseptor TNF tipe 1 dan Fas (CD 95). Fas-ligan (FasL) adalah membran protein yang terutama terkeksprei pada sel limfosit T yang teraktivasi. Ketika sel T ini mengenali sel yang mengekspresikan Fas, molekul Fas (*death receptor*) akan bertaut dengan FasL (*death ligand*) dan mengikat protein adapter dan *procaspase*. Komplek ini disebut *apoptosome* yang agregat transaktivasi *procaspase-8* menjadi *caspase-8*. Klastering molekul kaspase akan memicu aktivasi kaspase sehingga terjadi aktivasi kaskade kaspase. Kaspase tipe 8 dapat memecah dan megaktivasi famili Bcl-2 yang pro apoptosis yang disebut Bid, yang mana akan berlanjut ke jalur mitokondria. Seringkali, kedua jalur ini terjadi secara kombinasi. Protein sel yang disebut FLIP mengemblok aliran kaspase pada reseptor kematian.

Flowcytometry adalah metode terbaik untuk menganalisis apoptosis bermacam-macam sel karena cepat, akurat dan memberi analisis kuantitatif terhadap sejumlah sel yang diperiksa. Prinsip *Flowcytometry* dan *cell sorter* (*Flouroscene Activated Cell Sorter-FACT*) adalah menggabungkan kemampuan alat untuk mengidentifikasi karakteristik permukaan setiap sel dengan kemampuan memisahkan sel-sel yang berada dalam suatu suspensi menurut karakteristik masing-masing secara otomatis melalui suatu celah yang ditembus

oleh seberkas sinar laser. *Flowcytometry* baru pertama kali digunakan untuk memeriksa apoptosis pada spermatozoa di Fakultas Kedokteran UGM, sedangkan di luar negeri sudah sering dipergunakan (Ricci *et al.*, 2000; Sakkas *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004a,b). Beberapa teknik berbasis fluoresensi telah diterapkan untuk mengevaluasi ultrastruktur fungsional kelainan spermatozoa : integritas membran plasma, potensi transmembran mitokondria (MMP) dan *caspase - 3 activated*(Marchetti *etal.*, 2004a). Alat *Flowcytometer*dapat digunakan untuk pemeriksaan spermatozoa setelah mengalami *externalized phosphatidylserine* pada membran plasma luar sebagai indikator apoptosis, menunjukkan terjadinya gangguan pada MMP, atau *caspase-3 activated (cytosolic aspartate-specific protease 3)* dan berhubungan dengan infertilitas pria (Anzar *et al.*, 2002). Salah satu larutan yang digunakan dalam pemeriksaan *Flowcytometry* adalah *Annexin V Binding*.

Dalam sel, penyebaran *fosfolipid fosfatidilkolin* dan *sphingomyelin*, konstituen membran plasma, asimetris melintasi membran. Sementara fosfatidilkolin terkena *eksternal phosphatidylserine* terletak pada permukaan bagian dalam lapisan ganda lipid. Asimetri ini menghilang selama apoptosis dan untuk membuat sel-sel apoptosis target yang lebih menarik untuk ditelan oleh makrofag, *phosphatidylserine* menjadi terkena pada lapisan luar membran (Tahmineh *et al.*, 2007).Antikoagulan annexin protein V menunjukkan afinitas tinggi dalam mengikat *phosphatidylserine*. Cara ini menggunakan fluorochrome-terkonjugasi annexin V sebagai penanda apoptosis (Koopman*etal.*,1994).Setelah induksi apoptosis ekspresi *phosphatidylserine* pada permukaan luar membran

plasma terjadi sebelum hilangnya kemampuan untuk memisahkan pewarna kationik seperti PI. Pada tahap awal apoptosis sel mengikat annexin V tapi tidak PI. Pada tahap selanjutnya sel menunjukkan keduanya yaitu, annexin V binding dan PI fluoresensi. Hasil yang diperoleh dengan metode ini, mungkin ada bias dengan adanya sel-sel non-apoptosis yang memiliki membran plasma rusak dengan *phosphatidylserine* yang mengikat annexin V. Secara khusus, isolasi sel dengan pemilahan mekanis atau enzimatis jaringan, ekstensif menggunakan enzim proteolitik untuk melepaskan sel dari perlekatan, penghapusan mekanik sel dari tempat kultur jaringan, elektroporasi sel atau transfeksi, yang semuanya dapat mempengaruhi asimetri plasma membran fosfolipid dan menyebabkan pengikatan annexin V oleh sel non-apoptosis.

Evaluasi FACS untuk MMP dan deteksi EPS harus dilakukan pada hari yang sama (Sonja *et al.*, 2008). Ada beberapa petanda apoptosis antara lain perubahan morfologi sel (Gandini *et al.*, 2000), fragmentasi DNA (Barroso *et al.*, 2000), dan terjadinya kegagalan apoptosis selama spermatogenesis (Almeida *et al.*, 2005).

Beberapa proses fisiologi spermatozoa dimediasi oleh organela/molekul yang juga bertugas sebagai *biomarker* apoptosis, sebagai contohnya adalah kehilangan membran potensial mitokondria dapat menghasilkan pelepasan *cytchrome-c* kedalam *cytosol* sebagai pemicu *caspase-9* dalam jalur apoptosis (Kroemer & Reed, 2000), padahal kehilangan membran potensial mitokondria mempunyai efek langsung terhadap motilitas sperma (Marchetti *et al.*, 2004b). Proses apoptosis diawali dengan eksternalisasi fosfolipid dan radiasi gelombang

elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menghambat apoptosis melalui *caspase -3* pada jalur apoptosis (Leszczynski *et al.*, 2002).

Pemicu terjadinya apoptosis antara lain berupa iskemia, TNF- α , kekurangan faktor pertumbuhan, radiasi dan racun. Pemicu ini akan mengganggu jalur caspase yang berakibat terjadi kerusakan DNA yang mendorong terjadinya apoptosis melalui protein p53. Proses yang dapat meningkatkan apoptosis dapat terjadi melalui pembentukan mediator lokal efektif terhadap apoptosis, ekspresi melalui reseptor yang tidak sesuai, atau perangsangan rangkaian sinyal yang tidak tergantung reseptor. Keadaan ini dikarenakan oleh iskemia, toksin, pengerutan sel osmotik yang hebat, radiasi, inflamasi (infeksi penyakit autoimun) (Stefan & Florian, 2013). Selama spermiogenesis, apoptosis memainkan peran kunci dalam menyesuaikan jumlah sel germinal yang berkembang biak dan sel Sertoli. Faktor eksternal yang dapat menyebabkan peningkatan laju apoptosis, seperti pajanan radiasi dan adanya H₂O₂.

Dalam proses apoptosis tidak menimbulkan reaksi radang karena sitoplasma sel tidak keluar, sel mati difagositosis oleh makrofag (Said *et al.*, 2010; Zorn *et al.*, 2010). Proses apoptosis dibagi menjadi 3 fase yaitu fase induksi, fase efektor, fase degradasi. 1) Pada fase induksi tergantung sinyal penyebab kematian yang menstimulasi sinyal proapoptotik dan memulai kaskade. Sinyal penyebab kematian tersebut antara lain *reactive oxygen species* (ROS) (Deshpande *et al.*, 2000), *ceramide* (Yoshimura *et al.*, 1998), aktivasi berlebihan dari jalur Ca²⁺, protein famili B-cell lymphoma-2 (Bcl2) seperti *Bcl2 associated x protein* (Bax) dan *Bcl-2 associated death promotor* (Bad). 2) Pada fase efektor, sel mengalami

kematian karena kerja pusat pengatur yaitu mitokondria mengarah pada kematian sel. 3) Fase degradasi, melibatkan peristiwa baik di sitoplasma dan di dalam inti sel. Aktivasi *caspase* terjadi di dalam sitoplasma sedangkan pada inti sel terjadi kondensasi kromatin, selubung inti pecah dan terjadi fragmentasi DNA untuk selanjutnya menjadi *apoptotic body* yang difagositosis oleh sel sekelilingnya maupun oleh makrofag.

Regulasi apoptosis di dominasi berbagai protein intraseluler yang menginduksi atau menghambat proses apoptosis, seperti BAX, Bcl dan *caspase-3* (Cayli *et al.*, 2004). *Caspase* sebagai prekursor tidak aktif dan diaktifkan oleh inisiator caspase melalui proteolisis autoactive (Ceruti *et al.*, 2003). Inisiator caspases 8 dan 9 dengan efektor caspase 3 adalah pelaksana utama apoptosis (Riedl & Shi, 2004).Efektor *caspase 3* melalui jalur mitokondria (*caspase 9*) dan jalur *deathreceptor* melalui inisiator *caspase 8* (Pommier *et al.*, 2004). Jalur mitokondria dipicu oleh berbagai rangsangan intraseluler (misalnya untuk kerusakan DNA, kerusakan cytoskeletal, stres retikulum endoplasma,dan penghambatan sintesis makromolekul) yang menginduksi mitokondria luar membran permeabilisation (MOMP), yang diikuti dengan pelepasan sitokrom c dan pembentukan apoptosome (Spierings *et al.*, 2005). Biasanya *caspase-9* dan *caspase-3* diaktifkan untuk mengeksekusi apoptosis.

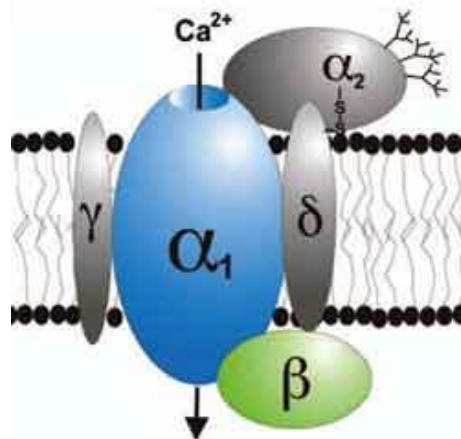
Aktivitas Caspase-3 yang meningkat dalam studi *in-vivo* pada tikus setelah terpajan radiasi, menunjukkan efek pada apoptosis (Oehninger *et al.*, 2003). Pajanan radiasi ponsel juga meningkatkan aktivasi hsp27, menyebabkan penghambatan jalur apoptosis (melibatkan *apoptosome* dan *caspase 3*). Kejadian

ini tampak ketika sel terpajan radiasi, secara spontan atau faktor eksternal menginduksi kerusakan /transformasi (Leszczynski *et al.*, 2002). *Caspases* diaktifkan oleh sinyal apoptosis berbagai substrat seluler membelah seperti aktin, poli (ADP-ribosa) polimerase, fodrin dan lamin, yang bertanggung jawab terhadap perubahan morfologi sel. Oleh karena itu, aktivasi apoptosis dan aktivasi bersamaan jalur anti-apoptosis bertanggung jawab untuk meningkatkan kelainan morfologi sperma.

C. Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC)

1. Struktur Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC)

Voltage-gated Ca²⁺ Channel (VGCC) atau CatSper adalah kanal ion Ca²⁺ terekspresi pada sel germinal laki-laki meskipun ada *Voltage-GatedCa²⁺ Channel* jenis lain beradadi sel lain. Kanal ion Ca²⁺ berisi 6 segmen transmembran, yang hampir sama dengan *voltage-gated potassiumchannel* tetapi elektivitas pori-pori ion sama dengan kanal Ca²⁺. Spermatozoa memiliki beberapa kanal kalsium permeabel, termasuk *high voltage-gated calcium channel*, dan *transient receptor potensial* (TRP) *channel* berdasarkan *imunostaining*. Tipe *voltage-gated calcium channel* antara lain : N-, R- dan T adalah kanal yang terdapat di sel spermatogenik atau spermatozoa mature (Timothy *et al.*, 2001).



Gambar 6. Struktur VGCC (William& Ford, 2001)

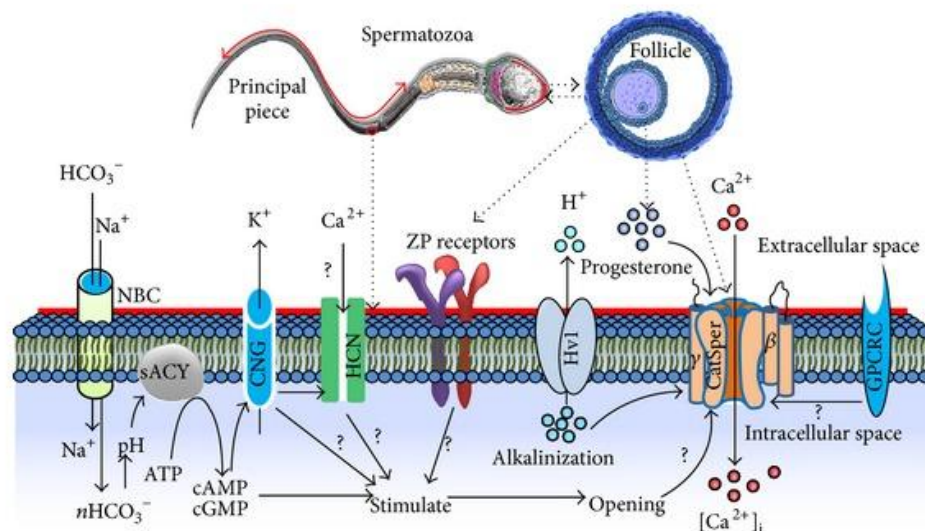
Keterangan : Gambaran tiga dimensi VGCC

Ada beberapa tipe kanal Ca^{2+} berdasarkan selektivitas ionik, konduksi dan distribusi jaringansemacam kanal Na^+ , Ca^{2+} , dan K^+ dimana *ligand-gated ion channels* diklasifikasikan berdasarkan *primary signaling transmitter*, semacam *acetylcholine*, *5-hydroxy tryptamine (5-HT)*, dan *g-amino butyric acid (GABA)*. Menurut Di-Zhang &Murali (2005), ada dua kelompok kanal kalsium dalam mekanisme pembukaan kanal kalsium yaitu Kanal terbuka tergantung depolarisasi membran plasma (*Voltage Operated Channels = VOCs*) dan Kanal terbuka tergantung *agonist binding (Receptor Operated Channels = ROCs)*.

Jalan menuju pori-pori kanal ion melalui pintu yang membuka atau menutup oleh pengaruh listrik, kimia, radiasi, atau kekuatan mekanik, contohnya *voltage-gated channels sense* perubahan potensial transmembran, *ligand-gated channels* membuka sebagai respon spesifik ligan, dan *cyclic nucleotide* atau kanal Ca^{2+} -activated respon terhadap *second messengers*. Ion Ca^{2+} sebagai determinan

primer fungsi sel sperma, termasuk kapasitas, progresivitas motilitas, hiperaktif motilitas, dan reaksi akrosom (Di-Zhang & Murali, 2005).

Beberapa kanal ion yang terdapat pada sperma antara lain *Voltage-gated* Ca^{2+} (CatSper), *Cyclic nucleotide gated channel* (CNG), *Transient receptor potensial channel* (TRP), inhibitor dari kanal TRP dapat menghambat motilitas sperma manusia, *Voltage dependent selective anion channel* (VDAC) yang terdapat pada membran luar dari mitokondria berperan mengatur keluarmasuk ion-ion, metabolit termasuk ATP dari dan keluar mitokondria (Liu *et al.*, 2001), *Second Messenger Operated Channels* (SMOCs), kanal ini berhubungan dengan reseptor melalui *second messenger*. SMOCs melepaskan dari simpanan internal (*calcium influx factor*-CIF; *inositol 1,4,5-triphosphatase*-IP3; *Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate*-IP4 aktif sebagai pengatur *second messenger* dalam pembukaan kanal Ca^{2+} pada membran plasma (Pinto *et al.*, 2004).



Gambar 7. Bagian-bagian dari spermatozoa (Rahman *et al.*, 2014)

Keterangan : proses masuknya Ca^{2+} di spermatozoa

Mekanisme masuknya Ca^{2+} intraseluler ke dalam spermatozoa melalui CatSper. *CatSper-dependent* meningkatkan $[\text{Ca}^{2+}]$ intraseluler di spermatozoa (Rahman *et al.*, 2014) yang diinduksi oleh beberapa rangsangan psikologis seperti *cyclic nucleotides* (seperti cAMP dan cGMP) (Hess *etal.*, 2005), soluble *adenylyl cyclase* (Esposito *et al.*, 2004), *zona pellucida glycoprotein* (Florman, 1994), serum albumin (Xia & Ren, 2009), *intracellular alkalization* (Mannowetz *et al.*, 2013), dan pH (Lishko *et al.*, 2011). Beberapa komponen lainnya juga dikenal untuk memainkan peran penting dalam mekanisme masuknya Ca^{2+} di spermatozoa mamalia dengan mengatur pembukaan anggota CatSper, termasuk *flagellar voltage-gated proton channel* (Hv1) (Lishko *et al.*, 2011), pompa Ca^{2+} -ATPase (Wennemuth *et al.*, 2003), beberapa *cyclic nucleotide-gated* kanal ion (CNG), kanal *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* (HCN) dan *G-protein coupled receptors* (GPCRs).

Jenis *Voltage-Gated calcium channels* (VGCC) berbeda sesuai dengan fungsi seluler seperti reaksi akrosom dan motilitas sperma. *Low-voltage-activated calcium channels* (LVA-CC), berespon terhadap proses spermatosit dan esensial untuk reaksi akrosom, dan *high-voltage activated Ca^{2+} channels* aktif selama proses reaksi akrosom melalui pembukaan kanal kalsium yang berlebihan (Jessica *et al.*, 2007). Kanal N- dan R-type *voltage-gated Ca^{2+}* dan *Low-voltage-activated T-type Ca^{2+}* ada di sel spermatogenik juga kanal *high voltage-gated* (Cav1.2, 2.1, 2.3) dan *low voltage-gated* (Cav3.1, 3.2, 3.3) Ca^{2+} .

Pada sperma manusia, ekspresi kanal *voltage-gated* Ca^{2+} subunit dan 6 transmembran ion *channel-like proteins*, dinamakan CatSper (*cation channel of sperm*)/(*Cav channels*), dan 4 anggotanya—CatSper1, CatSper2, CatSper3, dan CatSper4. Ekspresi kanal *transient receptor potential* (TRP) dan *cyclic nucleotide-gated channels* (CNGC), terdeteksi pada sel spermatogenik dan sel matur, berperan dalam motilitas sperma dan reaksi akrosom. Kanal CNG, terdapat pada flagella, sebagai jalan masuknya jalur Ca^{2+} di sperma dan kanal TRP blockers, semacam SKF96365, menghambat konsentrasi motilitas sperma (Di-Zhang & Murali, 2005).

Pompa ATPase digunakan untuk mendorong Ca^{2+} untuk masuk ke retikulum endoplasma (ER) melalui *Sarcoplasmic reticular* Ca^{2+} ATPase; SERCA pompa, atau ke luar dari sel (melalui *membrane plasma* Ca^{2+} ATPase; PMCA pompa). Inisiasi motilitas sperma berhubungan dengan *voltage gated calcium channels* yang melewati membran plasma. *Second messenger* semacam siklik adenosin monofosfat (cAMP) dan Ca^{2+} memainkan peran kunci di dalam ekspresi motilitas sperma pada beberapa hewan (Shunyang *et al.*, 2004). Konsentrasi cAMP intraseluler mengontrol kadar fosforilasi pada protein spesifik terutama protein kinase A (PKA), dan secara langsung menginisiasi gerakan eksonem. Ca^{2+} meningkatkan cAMP melalui aktivasi *adenylyl cyclase* di spermatozoa (Shunyang *et al.*, 2004).

2. Bahan-bahan yang mempengaruhi fungsi VGCC

a. Verapamil

Calcium channel blockers sebagai obat antihipertensi bersifat menutup kanal kalsium sehingga berefek pada penurunan fungsi spermatozoa. Umumnya pengobatan hipertensi ada dua macam yaitu *calcium antagonist (calcium channel blockers)* dan *Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor* berupa monoterapi dan *replacing traditional antihypertensiv medication* (misalnya diuretik, β -blocker, vasodilator). *Calcium antagonist* terdiri atas tiga kelas obat yaitu *1,4-dihydropyridine* (prototipenya nifedipine), *Phenylalkylamines* (prototipenya verapamil), *Benzothiazepin* (prototipenya diltiazem). Ketiga kelas obat ini mempunyai ikatan dengan afinitas tinggi yang berbeda-beda tetapi semuanya ada ketertarikan dengan reseptor site pada inti α_1 subunit L-subtype (*long-lasting-large current*) terhadap VGCC dalam sel spermatozoa. Kalium menginduksi peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler spermatozoa yang dihambat oleh *prenylamine*, *diltiazem*, *nifedipine* atau verapamil. Aktivasi yang baik *Voltage-gated Ca^{2+} (CatSper)* spermatozoa memainkan peran penting dalam menghasilkan reaksi akrosom (AR) dan spermatozoa dengan pajanan *Ca antagonist* menghambat induksi zona pelusida tergantung dosis tertentu.

Besarnya dosis verapamil yang berhubungan dengan motilitas sperma sebesar 100 μM (Shuyang *et al.*, 2004). Ca^{2+} adalah faktor kunci dalam aktivasi motilitas sperma pada beberapa spesies. Penghambatan dihubungkan dengan kation divalent dan dihubungkan dengan *voltage-gated calcium channels* membran plasma. Kanal membran untuk kation divalen, termasuk Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Sr^{2+} terdapat pada spermatozoa ikan (Shuyang *et al.*, 2004). Penelitian ini

menggunakan verapamil sebagai bahan/kontrol yang dapat menunjukkan proses penutupan kanal kalsium.

b. Thapsigargin

Thapsigargin adalah sebagai *inhibitor sarco-endoplasmic reticulum ATPase* yang terdapat dalam spermatozoa manusia, sehingga menghambat pelepasan Ca^{2+} dari penyimpanan internal, dan dapat mengganggu reaksi akrosom spermatozoa manusia tetapi hanya melewati Ca^{2+} influks dari medium eksternal yang terinduksi setelah ditambahkan thapsigargin (Blackmore, 1993). Thapsigargin mengganggu pengambilan Ca^{2+} oleh *Sarcoplasmic reticular Ca^{2+} ATPase*, SERCA pompa. Penghambatan Ca^{2+} ATPase oleh thapsigargin menyebabkan Ca^{2+} keluar dari gudang penyimpanan di retikulum endoplasma intraseluler berjalan lambat (Blackmore, 1993). Dosis thapsigargin untuk menghambat pelepasan kalsium dari gudang penyimpanan Ca^{2+} di retikulum endoplasma intraseluler sebesar $2\mu\text{M}$ (Meizel & Turner, 1993).

Tidak adanya Ca^{2+} ekstraseluler, thapsigargin menyebabkan sinyal Ca^{2+} bersifat sementara. Ini sesuai isi Ca^{2+} yang terbatas di dalam retikulum endoplasma intraseluler dan pemindahan progresif ion oleh plasma membran ATPase menjadi tidak sensitif terhadap thapsigargin (Meizel & Turner, 1993). Pengurangan jumlah Ca^{2+} dalam retikulum endoplasma intraseluler mengaktifkan jalur masuk Ca^{2+} atau *store operated Ca^{2+} entry* sebagai konsekuensinya penambahan kembali Ca^{2+} pada buffer ekstraseluler dihubungkan dengan kecepatan sinyal masuknya Ca^{2+} (Meizel & Turner, 1993). Penelitian ini

menggunakan thapsigargin sebagai bahan/kontrol yang dapat menunjukan proses penutupan kanal kalsium.

c. Progesteron

Pada *in vitro*, kapasitasi adalah proses perubahan komposisi lipid membran plasma sperma, yang menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler, meningkatnya cAMP signaling, perubahan fosforilasi protein, induksi dari reaksi akrosom, meningkatkan aktivitas spermatozoa ke zona pelusida, perubahan dalam pola gerakan flagellar, induksi hiperaktivitas motilitas dan modifikasi dalam glycocalyx spermatozoa (Jaiswal & Eisenbach, 2002; Baldi *et al.*, 2009).

Pada konsentrasi Progesteron 1 μ M menginduksi peningkatan hingga kenaikan tiga kali lipat dalam persentase spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom zona pelusida tetapi protein sperma tirosin fosforilasi tidak berubah (Sumigama *et al.*, 2015), dan Progesteron mempercepat penyelesaian kapasitasi.

Menurut Sumigama *et al.* (2015), Progesteron memicu spermatozoa monyet mengaktifasi CatSper, meningkatkan zona binding, dan hiperaktivasi. Tirosin fosforilasi protein sperma tidak terpengaruh paparan progesteron, namun kemampuan sperma untuk mengikat zona pelusida, dan melakukan reaksi akrosom tampaknya jelas tergantung progesteron. Penelitian Sumigama *et al.* (2015), menyebutkan bahwa progesteron menginduksi perubahan gerak spermatozoa monyet mengarah ke hiperaktivitas motilitas, mempromosikan zona-induced reaksi akrosom (AR), meningkatkan AR lebih dari 3 kali lipat, tidak memiliki efek pada kapasitasi terkait tirosin fosforilasi protein spermatozoa dan ekspresi progesteron-sensitif kanal CatSper pada spermatozoa

monyet. Pada manusia,progesteron telah terbukti secara langsung menyebabkan kapasitas dan AR (Baldi *et al.*, 2009).

Progesteron sebagai pemicu pembukaan kanal kalsium (CatSper). Intervensi spermatozoa manusia dengan 1 μ M dan 3 μ M progesteron memicu peningkatan dalam persentase hiperaktivitas motilitas spermatozoa pada pria normal (Uhler *et al.*, 1992) dan pria infertil (Oehninger *et al.*, 1994). Sedangkan dalam penelitian ini konsentrasi progesteron yang digunakan adalah 0.1 μ g/mL (Elisabetta *et al.*, 2011).

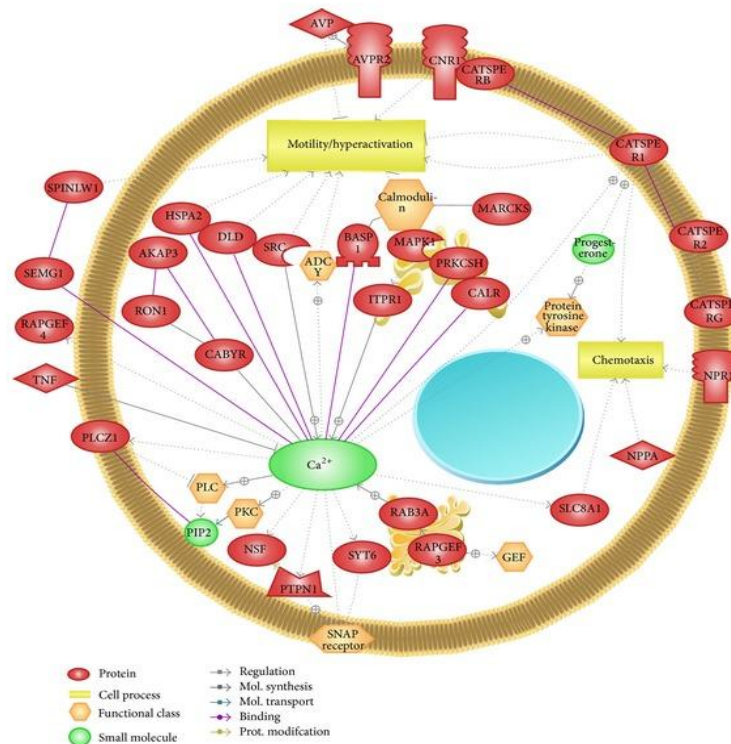
Efek dari progesteron pada AR dan motilitas spermatozoa monyet karena kemampuan progesteron untuk merangsang peningkatan [Ca²⁺] spermatozoa. Elevasi [Ca²⁺] intraseluler yang dihasilkan dari masuk dan lepasnya dari penyimpanan kalsium intraseluler adalah penting dalam fungsi spermatozoa, yang mengarah ke perubahan motilitas sperma, dan remodeling membran lipid sperma yang utama untuk zona-binding dan ZP-induced AR (O'Toole *et al.*, 2000).

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa efek primer dan langsung progesteron pada motilitas spermatozoa melalui mobilisasi Ca²⁺ melalui kanal CatSper (Smith *et al.*, 2013; Strunker *et al.*, 2011). Kanal CatSper terletak di bagian *principle piece* spermatozoa dan diperlukan untuk hiperaktivitas motilitas (Carlson *et al.*, 2009). Progesteron tergantung kenaikan arus ion melalui kanal CatSper kation menginduksi hiperaktivasi (Smith *et al.*, 2013; Lishko *et al.*, 2011). Progesteron juga telah terbukti menyebabkan mobilisasi Ca²⁺ di kepala sperma, bekerja melalui *gamma-aminobutyric acid* (GABA)–like receptor di membran plasma (Meizel *et al.*, 1997).Peningkatan Ca²⁺ di kepala sperma juga

karena ekor sampai kepala mengalami propagasi dari Ca^{2+} setelah aktivasi kanal CatSper (Xia *et al.*, 2009). Apapun sumber Ca^{2+} , progesteron merangsang gelombang intraseluler kation ini ke kepala sperma, terutama secara langsung pada AR atau meningkatkan zona-diinduksi AR (Schuffner *et al.*, 2002).

Peningkatan respon pada progesteron paralel dengan peningkatan Ca^{2+} dalam kapasitasi sperma dan kemampuan sperma untuk mengakumulasi Ca^{2+} pada sitoplasma adalah hal penting untuk persiapan sel dalam reaksi akrosom. Adanya serum albumin dalam medium meningkatkan permeabilitas sel sehingga terjadi peningkatan Ca^{2+} pada spermatozoa, dan terjadi peningkatan reaksi akrosom (Elisabetta *et al.*, 2011).

Kondisi kapasitasi konsisten dengan kondisi periovulatory oviductal cairan pada wanita dan primata non-manusia terhadap pH, konsentrasi bikarbonat, dan kadar glukosa (Tollner *et al.*, 2009). Penambahan progesteron mempercepat penyelesaian kapasitasi spermatozoa monyet, yang dibuktikan dengan reaksiakrosom ZP-diinduksi dan hiperaktivitas motilitas (Sumigama *et al.*, 2015). Penelitian ini menggunakan progesteron sebagai bahan/kontrol yang dapat menunjukkan proses pembukaan kanal kalsium (CatSper). Untuk lebih jelasnya bisa dilihat pada gambar berikut.



Gambar 8. Pengaturan Ca^{2+} pada spermatozoa

Keterangan : Interaksi 35 protein dengan pengaturan Ca^{2+} pada hiperaktivasi/motilitas spermatozoa

3. Pemeriksaan Ekspresi Voltage-Gated Calcium Channels (VGCC)

Pemeriksaan untuk mengetahui fungsi VGCC dikerjakan dengan pemeriksaan imunositokimia dengan VGCC dilabeling. *Imunocytochemistry* (ICC) adalah salah satu cara untuk menentukan lokasi antigen (protein target) dalam sel menggunakan reaksi antigen-antibodi (Gunther *et al.*, 2003).

Reaksi antigen-antibodi dalam imunositokimia menggunakan label biotin pada antibodi sekunder. Protein target berada pada sel, dan sebelum protein target direaksikan dengan antibodi primer, dilakukan prosedur bloking untuk menutup atau meminimalkan ikatan yang tidak spesifik antara molekul-molekul yang ada

di preparat sel dengan antibodi, kemudian baru ditetesi antibodi sekunder. Metode ICC ini kurang sensitif dalam menentukan jumlah (kuantitatif) protein dibanding pemeriksaan lain seperti ELISA, namun imunositokimia mampu mengobservasi proses pada sel sehingga metode ini sangat berguna untuk menilai keadaan suatu kanal di sel (Hong-Gang Li *et al.*, 2006).

Pengecatan imunositokimia dengan menggunakan antibodi yang mengenali protein target. Antibodi yang digunakan sangat spesifik maka antibodi hanya dapat mengikat protein yang diinginkan pada sel. Interaksi antibodi-antigen divisualisasikan menggunakan deteksi secara kromogenik (*chromogenic detection*) dimana enzim dikonjugasi dengan antibodi yang memecah substrat sehingga menghasilkan endapan berwarna di lokasi protein target atau dengan deteksi fluoresensi (*fluorescent detection*) dimana *fluorophore* dikonjugasi dengan antibodi dan divisualisasikan menggunakan mikroskop fluoresensi (Guntheret *al.*, 2003). Hasil imunositokimia yang digunakan dalam menilai ekspresi VGCC mengadopsi sistem skor visual untuk menghitung pewarnaan endothel untuk eNOS sebagai berikut skor 0 bila tidak ada pewarnaan; 1 bila pewarnaan positif >75 % sel (Cheng, 2005).

d. Ion Kalsium

Ionkalsium memainkan peran kunci dalam semua fungsi sperma setelah diejakulasi (Gonzalez *et al.*, 2006), sebagai *messenger* intraseluler terpenting dalam mengatur motilitas sperma yang dimediasi oleh kanal Ca^{2+} , dan beberapa kanal dapat menurunkan aktivitas sperma. Sumber utama Ca^{2+} digunakan untuk mengaktifkan sperma, berada di medium ekstraseluler dan mekanisme pengaturan

Ca^{2+} masuk melalui membran plasma memainkan peranan penting (Foresta & Rossato, 1997). Homeostasis Ca^{2+} pada sperma termasuk sejumlah tipe kanal Ca^{2+} permeabel pada membran plasma (Castellano *et al.*, 2003). Dalam kondisi fisiologis, Ca^{2+} adalah ion terpenting dalam regulasi motilitas sperma manusia. Hal ini tampak bahwa pada membran plasma dengan pinggir yang halus (flagella) yang pada permukaannya terdapat *voltage gated*, *cyclic nucleotide-gated* dan *transient receptor potensial calcium channel*. *Transient receptor potensial calcium channel* terdapat pada bagian ekor sperma dan berfungsi merangsang motilitas sperma melalui masuknya kapasitas (Castellano *et al.*, 2003).

CatSper spesifik terdapat pada ekor sperma berhubungan dengan gangguan motilitas secara progresif yang menyebabkan infertilitas. Peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler secara tidak langsung menyebabkan aktivasi simpanan Ca^{2+} intraseluler melalui *IP3 signaling*. Pada saat masuk, Ca^{2+} mengaktifkan fosfolipase dan juga memodulasi beberapa aktivitas enzim (Ho & Suarez, 2001). Subunit *voltage-gated Channel* (Cav2.3) memainkan peran dalam motilitas sperma. Ekspresi Cav2.3 dapat dideteksi sepanjang sisi dorsal dan ventral segmen proksimal dari tempat prinsipal sperma tikus, dan Cav2.3 dapat mengontrol influks Ca^{2+} selama pergerakan flagella asimetri (Di-Zhang & Murali, 2005).

Aktivitas Ca^{2+} /calmodulin (CaM) kompleks untuk merangsang motilitas sperma melalui interaksi langsung dengan larutan *adenylate cyclase* (sAC), protein kinase, fosfatase dan fosfodiesterase menyebabkan peningkatan cAMP dan fosforilasi protein sperma (Ignoz & Suarez, 2005). Karakteristik CaM pada aksonem sperma dan sebagai sensor pengatur Ca^{2+} intraseluler terhadap motilitas.

Kadar CaM menurun pada asthenozoospermia sehingga menghambat enzim yang berhubungan dengan motilitas sperma (Marin *et al.*,2005). CaM tergantung pada protein kinase, penghambatan isoform IV menghasilkan penurunan spesifik parameter motilitas dan kadar ATP tanpa mempengaruhi viabilitas sperma, protein *tyrosine phosphorylation* atau reaksi akrosom. Pada sperma diinkubasi, ketidakhadiran Ca^{2+} menyebabkan penurunan parameter motilitas, hal ini menunjukkan bahwa Ca^{2+} penting sebagai pemelihara motilitas sperma manusia (Marin *et al.*,2005). Ca^{2+} eksternal sebagai zat esensial untuk motilitas sperma, konsentrasi Ca^{2+} intraseluler harus diatur pada waktu sperma mengalami aktivasi (Luconi &Baldi, 1996). Penurunan kadar Ca^{2+} eksternal di antara kepala dan ekor epididimis dihubungkan dengan perkembangan progresif motilitas sperma dan peningkatan protein tirosin fosforilasi (Luconi &Baldi, 1996).

Membranplasma Ca^{2+} /calmodulin-dependent Ca^{2+} ATPase (PMCA) esensial untuk pemeliharaan homeostasis Ca^{2+} intraseluler sehingga PMCA4 sebagai pengatur fungsi sperma dan kadar Ca^{2+} intraseluler (Schuh *et al.*, 2004). Eksternal ionik dan atau perubahan osmotik menginduksi perubahan konsentrasi Ca^{2+} dan atau cAMP intraseluler, dan penghambatan motilitas sering menghasilkan ketidakmampuan spermatozoa menghasilkan dan atau mempertahankan kadar cAMP untuk menstimuli PKA (Shunyang *et al.*, 2004).Pemeliharaan homeostatis Ca^{2+} internal saat Ca^{2+} ekstraseluler tinggi menurunkan ketersediaan ATP untuk tirosin fosforilasi dan pergerakan sperma (Baker *et al.*, 2004).

Fosforilasi protein penting sebagai salah satu kunci dalam proses transduksi sinyal stimulator motilitas, termasuk spesifik kinase dan fosfatase. Motilitas spermatozoa berhubungan dengan peningkatan spesifik protein target tirosin fosforilasi di ekor sperma mengikuti tirosin dan aktivitas *serine-threonine kinase*, yang berhubungan negatif dengan fosfatase (Bajpai & Doncel, 2003). Kelainan spesifik protein tirosin fosforilasi di ekor sperma terhadap respon kapasitas asthenozoospermia dihubungkan dengan penurunan motilitas dan hiperaktivasi (Buffone *et al.*, 2005). Fosforilasi protein sperma diatur oleh keseimbangan antara aktivitas kinase dan fosfatase. Sistem adenilat siklase/cAMP/PKA termasuk tirosin fosforilasi dihubungkan dengan flagella dan motilitas sperma (Ficarro *et al.*, 2003). cAMP dihasilkan oleh aktivasi ikatan adenilat siklase PKA *holoenzyme* menginduksi pengeluaran dan aktivasi katalitik subunit. Aktivitas cAMP dan PKA merangsang motilitas sperma. cAMP berimplikasi sebagai aktivator sperma melalui jalur protein fosforilasi (Shuyang *et al.*, 2004).

e. Mekanisme pajanan radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa

Envirogenomik adalah istilah untuk menggambarkan suatu pengetahuan berbasis biologi molekuler yang mempelajari hubungan atau interaksi antara gen dengan lingkungan. Lingkungan dalam hal ini adalah ekosistem dan habitat yang ditinggali dan menjadi tempat beraktivitas manusia (Tauhid, 2008). Secara umum, pajanan radiasi gelombang elektromagnetik ada dua macam yaitu pajanan akut

dan kronik. Paparan akut dari radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dapat merangsang membran plasma yang mengandung NADH *oxidase* sehingga meningkatkan formasi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan ROS merangsang reseptor *endothelial growth factor* (EGF) yang aktif di jalur *extracellular signal regulated kinase* (ERK). Jalur ERK terdiri dari aktivasi Ras, protein Raf, dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Paul, 2011).

Paparan kronik menyebabkan timbulnya ROS dan menyebabkan variasi *stres kinase* (p38MAP kinase). Aktivasi p38MAP kinase merangsang jalur ERK dan berperan penting pada fosforilasi *heat shock protein* (Hsp) sebagai penghambat apoptosis. Menghambatan apoptosis meningkatkan *carcinogenesis* dalam waktu lama melalui kerusakan DNA. Hsp juga sebagai penstabil stres pada serabut endothel dan mengubah sekresi bFGF. Hal ini meningkatkan permeabilitas pembuluh darah testis dan menyebabkan infertilitas (Paul, 2011).

F. Landasan Teori

Salah satu dampak dari paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel adalah stres fisik. Stres fisik berupa paparan radiasi ponsel, kebisingan, tekanan panas, getaran, suhu, dan kelembaban. Paparan di atas dapat mempengaruhi kesehatan manusia secara langsung dan tidak langsung. Secara tidak langsung mempengaruhi sistem saraf pusat (gangguan *Axis Hypothalamus-Pituitary-Gonadal*). Gangguan ini menyebabkan produksi membran yang dihasilkan sel *Leydig* dan proses spermatogenesis yang dipengaruhi oleh membran sel Sertoli mengalami penurunan yang berakibat terjadinya infertilitas. Secara

langsung mempengaruhi membran plasma sel, karena membran plasma sel memainkan peran kunci dalam transduksi dan amplifikasi dari sinyal akibat pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel.

Efek radiasi pada reseptor di permukaan membran plasma dan di kanal Ca^{2+} . Radiasi mengaktifasi beberapa reseptor permukaan membran plasma (misalnya : *G-protein-coupled receptor* dan *receptor tyrosine kinase*) yang menginduksi kanal Ca^{2+} untuk mempengaruhi pintu kanal sehingga Ca^{2+} intraseluler tidak bisa masuk ke dalam sel dan mempengaruhi Ca^{2+} dari membran endoplasma. Hal ini disebabkan ROS dan sinyal Ca^{2+} mempunyai hubungan yang sangat erat dan keduanya merupakan sinyal molekul intraseluler yang sangat penting. Pajanan radiasi pada membran sel dan reseptor yang berada di membran merangsang jalur Ca^{2+} dan radikal bebas serta proses *redox regulated*, sedangkan beberapa reseptor permukaan membran diregulasi oleh proses *redox*.

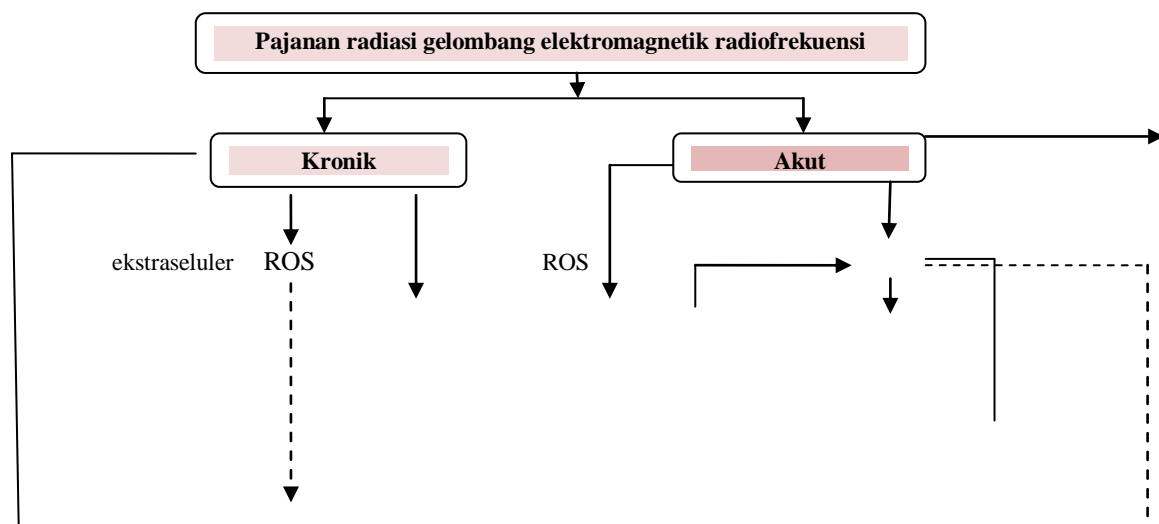
Reactive Oxygen Species (ROS) yang overproduksi dan gangguan pada kanal Ca^{2+} akibat pajanan gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menyebabkan terjadinya kerusakan sel spermatozoa sehingga berakibat infertilitas. Hal ini ditandai dengan penurunan parameter kualitas dan fungsionalitas spermatozoa berupa konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa, ekspresi VGCC, apoptosis, serta jumlah Ca^{2+} intraseluler.

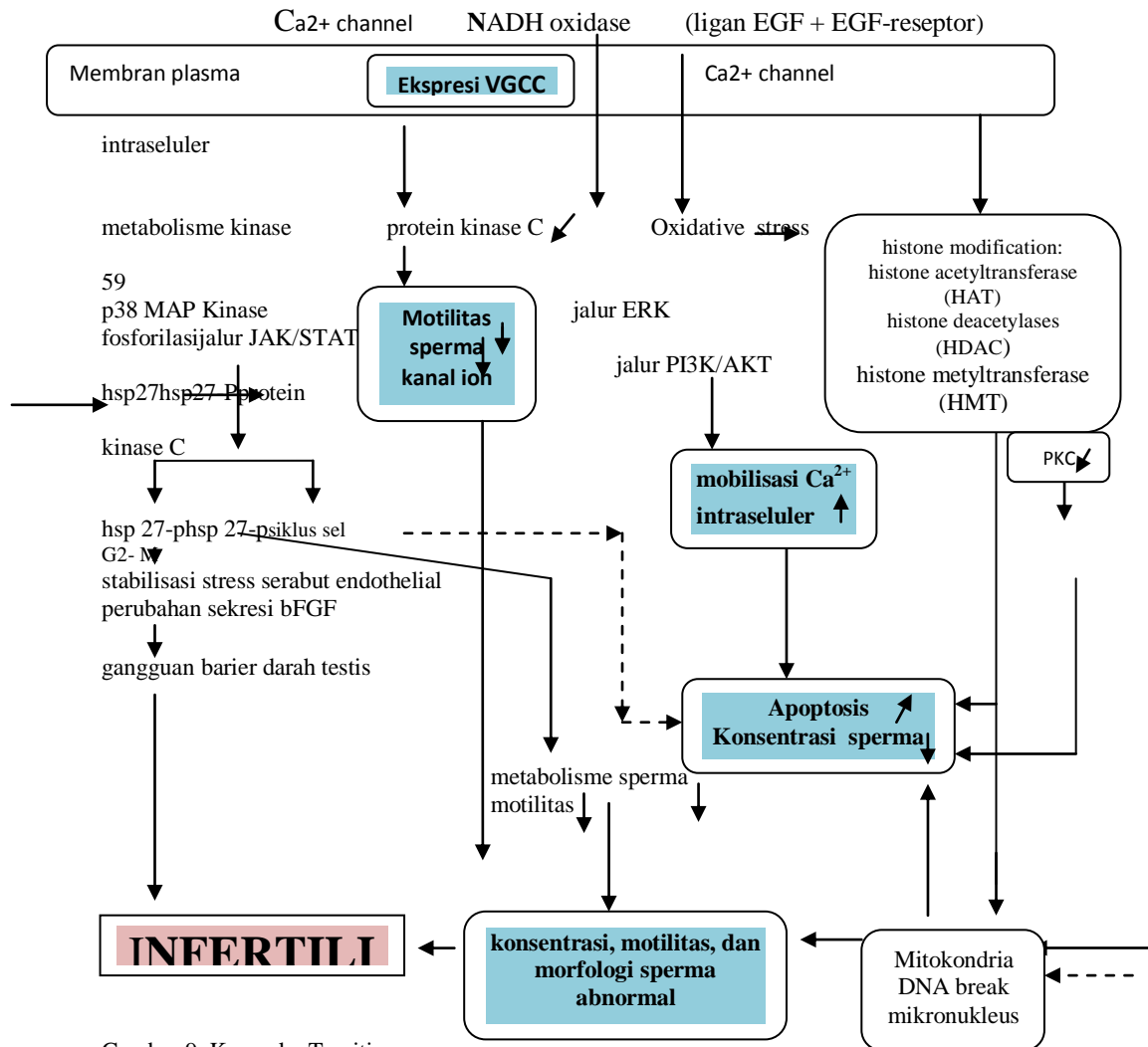
Pada spermatozoa terdapat berbagai macam kanal ion. Protein kanal diperlukan untuk mendukung proses keluar masuknya ion-ion spesifik yang dibutuhkan sperma, seperti proses fertilisasi, kapasitasi, motilitas sperma, dan reaksi akrosom, sehingga Ca^{2+} dianggap sebagai kunci sentral bagi fungsi

spermatozoa. Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel termasuk radiasi non-ionisasi, masuk ke dalam tubuh melalui medan listrik yang bereaksi dengan sel tubuh melalui berbagai jalur, antara lain melalui kanal ion Ca^{2+} atau *voltage-gated Ca^{2+} channels* (VGCC).

G. Kerangka Teoritis

Berdasarkan tinjauan pustaka diajukan kerangka teoritis dijabarkan di bawah ini.

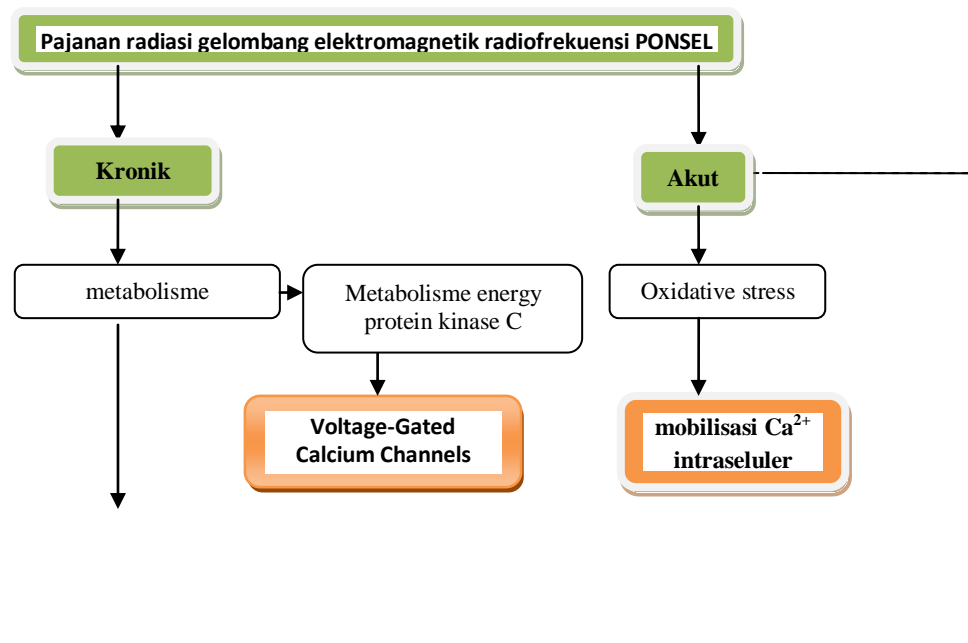


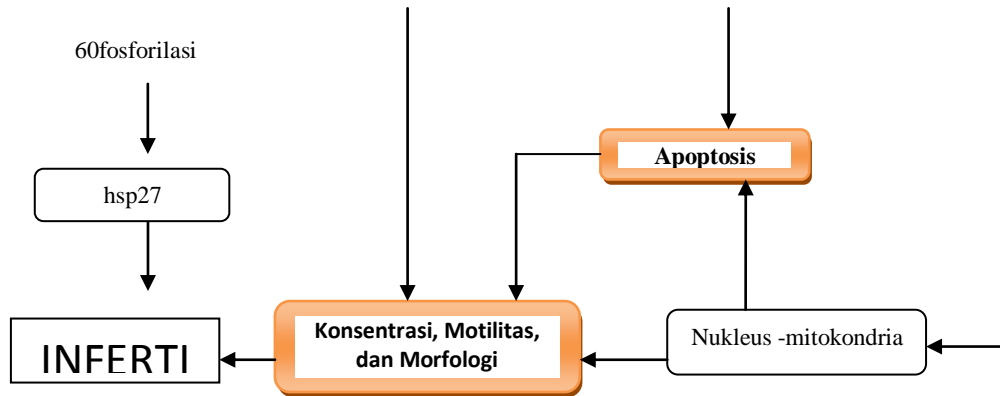


Gambar 9. Kerangka Teoritis

Keterangan : → memacu ; menghambat

H. Kerangka Konseptual





Gambar 10. Kerangka Konseptual

Keterangan :



Variabel bebas

Variable terikat

I. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kajian pustaka dan landasan teori di atas dapat disusun hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Hipotesis Mayor

- a. Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menurunkan kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*.
- b. Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menurunkan fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro*.
- c. Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menghambat Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa secara *in vitro*.

2. Hipotesis Minor

- a. Semakin lama dan semakin besar paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*.
- b. Semakin lama dan semakin besar paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro*.
- c. Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa menghambat kualitas spermatozoa setelah terpapar radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel secara *in vitro*.
- d. Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa menghambat fungsionalitas spermatozoa setelah terpapar radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel secara *in vitro*.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian Laboratorik Eksperimental dengan rancangan *pre-post test controlled group design*. Penelitian ini terdiri atas ada dua tahap, yaitu tahap pertama untuk mengungkap dampak pajanan radiasi ponsel

terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa dan tahap kedua untuk menunjukkan proses penutupan kanal kalsium akibat pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa.

B. Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Faal FK UGM. Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Faal untuk kualitas spermatozoa, Laboratorium Patologi Klinik FK UGM untuk pemeriksaan apoptosis dan Ca^{2+} intraseluler dengan *flowcytometry* dan untuk pemeriksaan *immunocytochemistry* (ICC) berupa ekspresi VGCC di Laboratorium Histologi FK UGM Yogyakarta. Penelitian telah dilaksanakan pada tanggal 1 Desember 2014 – 15 Januari 2015.

C. Subjek Penelitian

1. Sampel Penelitian

Sampel yang menjadi subyek penelitian adalah spermatozoa yang berasal dari ejakulat seorang pria yang sudah mengalami skrining sehingga memenuhi kriteria inklusi berupa laki-laki, sehat, umur 20-30 tahun, tidak merokok, tidak ada riwayat menderita penyakit degeneratif, kencing manis (DM), dan hipertensi, bersedia mengisi *informed consent*, serta bersedia mematuhi peraturan penelitian. Untuk menjaga agar donor spermatozoa tetap dalam kondisi prima, dan untuk pengendalian bias maka donor sperma dikarantina dan diberi makanan tambahan berupa protein tinggi (telur rebus dua kali sehari selama 2 minggu) dan menjauhkan diri dari pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi selama dua minggu sebelum penelitian dilaksanakan. Pengambilan sampel semen

dilakukan dengan selang waktu berjarak sekitar 5-7 hari. Dalam penelitian ini, subyek penelitian didapatkan dari sekali ejakulasi untuk sampel penelitian. Subyek penelitian adalah spermatozoa yang berasal dari ejakulat seorang pria yang mempunyai spermatozoa normal menurut kriteria WHO(1999) yaitu : konsentrasi sperma $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ dan bentuk morfologi normal $\geq 30\%$. Semen diperoleh dengan cara masturbasi dan ditampung ke dalam botol kaca steril yang bermulut lebar setelah abstinentia 3-4 hari. Setelah likuifaksi 30 menit, semen diberi media washing bernutrisi *Bicarbonate and HEPES buffered medium* berisi human serum albumin (SpermRinse Vitrolife) 1 : 1, kemudian dilakukan analisis spermatozoa menurut kriteria WHO (1999).

2. Cara pengambilan sampel

Pada penelitian tahap pertama, subyek penelitian dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan duplikasi masing-masing 5, yaitu :

- (1) kelompok 1 adalah kelompok kontrol (kelompok yang tidak mendapat perlakuan apapun selama 1 jam)
- (2) kelompok 2 adalah kelompok kontrol (kelompok yang tidak mendapat perlakuan apapun selama 2 jam)
- (3) kelompok 3 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 2 W/kg selama 1 jam)
- (4) kelompok 4 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 2 W/kg selama 2 jam)

- (5) kelompok 5 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 5.7 W/kg selama 1 jam)
- (6) kelompok 6 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 5.7 W/kg selama 2 jam)

Penentuan kelompok secara acak dengan memberikan volume yang sama pada tiap-tiap kelompok yaitu 150 μ L untuk tiap sumuran. Pembagian kelompok ini juga berlaku untuk penelitian tahap kedua.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Pajanan radiasi ponsel
2. Variabel Terikat :
 - a. Kualitas spermatozoa : konsentrasi, motilitas dan morfologi spermatozoa
 - b. Fungsionalitas spermatozoa : jumlah sel apoptosis, jumlah kalsium intraseluler,
 - c. Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel*(VGCC)

E. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel:
 - a. Pajanan radiasi bersumber dari ponsel GSM (*Global system for mobile Communications*) 900 MHz dalam keadaan bicara.

- b. Paparan akut adalah lama paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel selama kurang dari atau sama dengan satu jam dan paparan kronik adalah lama paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel lebih dari atau sama dengan dua jam (Desai *et al*, 2009).
 - c. *Specific Absorption Rate* (SAR) adalah ukuran rata-rata energi radiofrekuensi yang diabsorpsi oleh tubuh, dalam penelitian ini, sebesar 2 W/kg dan 5,7 W/kg, Alat ukur: *detection electromagnetic radiation*.
 - d. Jarak antara antena ponsel dengan tiap spesimen sekitar 0.8-1.8 cm (Mouradi *et al.*, 2011). Berdasarkan metode *Finite Difference Time Domain* (FDTD) dengan komputer untuk mengkonversikan tebal lapisan jaringan tubuh dengan jarak ponsel dan spermatozoa di dalam testis.
 - e. Satuan: Watt/kg
 - f. Skala pengukuran rasio
2. Kualitas spermatozoa adalah keadaan sperma yang pada penelitian ini diamati dari segi : konsentrasi, motilitas, morfologi spermatozoa.
- a. Konsentrasi spermatozoa adalah jumlah spermatozoa per unit volume semen ($\times 10^6/\text{mL}$ semen). Penghitungan menggunakan kamar hitung *improved Neubauer haemocytometer*. Pemeriksaan dilakukan sesuai panduan WHO (1999), satuan sel sperma juta/mL, skala pengukuran rasio.

- b. Motilitas spermatozoa adalah persentase spermatozoa yang bergerak per unit area, cara pemeriksaan sesuai WHO (1999). Motilitas sperma dicatat dalam persentase dengan kategori 1) *Fast progressive*(A) apabila sperma bergerak cepat progresif dan lurus ke muka, 2) *Slow progressive*(B) apabila sperma bergerak lambat progresif, 3) *Non-Progressive* (C) apabila sperma tidak bergerak progresif, tidak ada kemajuan, hanya gerakan flagella, 4) *Non-motile*(D) apabila spermatozoa tidak bergerak. Satuan dalam persentase, skala pengukuran rasio.
- c. Morfologi sperma menggunakan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) sesuai pemeriksaan WHO (1999) dan diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000x dan emersion oil. Morfologi sperma sesuai kriteria WHO (1999), dengan menilai bentuk morfologi normal, kelainan kepala, kelainan leher, kelainan ekor dan sitoplasma spermatozoa. Morfologi spermatozoa normal apabila memiliki kepala berbentuk oval dengan bagian anterior pucat (akrosom, 40-70% dari daerah kepala) dan gelap di daerah posterior. Ekor sperma simetris terletak di dasar kepala, hanya satu ekor, tidak melingkar, sobek atau membungkuk di atas dirinya sendiri (WHO, 1999). Kelainan morfologi spermatozoa pada kepala antara lain besar, kecil, meruncing, berbentuk buah pir (*pyriform*), bulat, amorf, daerah akrosom kecil, kepala ganda, *pin head* atau kepala mikro (WHO, 1999). Kelainan morfologi spermatozoa pada leher antara lain ekor bengkok, ekor asimetris,

tebal atau tidak teratur *midpiece* atau kombinasi dari abnormalitas lainnya (WHO, 1999).Kelainan morfologi spermatozoa pada ekor antara lain pendek, ganda (*multiple*), jepit rambut, patah, membungkuk, ekor digulung atau kombinasi dari kelainan lainnya. Ekor bebas/lepas, melingkar (WHO, 1999). Skala dalam persentase, skala pengukuran rasio.

3. Fungsionalitas spermatozoa adalah keadaan fungsi sperma berupa : perubahan induksi selama kapasitas, perubahan apoptosis sel spermatozoa, decondensasi kepala spermatozoa selama fertilisasi, deteksi stress oksidasi dan lipid peroksidase, serta konsentrasi kalsium intraseluler pada sel spermatozoa (Sharoareet *al.*, 2011). Pada penelitian ini dibatasi pada fungsi spermatozoa berupa jumlah sel apoptosis dan konsentrasi Ca^{2+} Intraseluler.

- a. Jumlah sel apoptosis adalah jumlah sel apoptosis yang dianalisis menggunakan *flowcytometry* untuk mengkonfirmasi adanya sel apoptosis setelah terpajan ponsel dengan pewarnaan *propidium iodide* (PI) dan *Annexin V Fluores staining*, satuan persentase sel apoptosis (%), skala pengukurannya rasio.
- b. Jumlah Ca^{2+} intraseluler dianalisis menggunakan *flowcytometry* untuk mengkonfirmasi adanya Ca^{2+} intraseluler setelah terpajan ponsel dengan Ca^{2+} probe *Fluo-3 AM* dan *propidium iodide*(PI), satuan persentase Ca^{2+} intraseluler (%), skala pengukurannya rasio.

4. Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel*(VGCC)adalah penilaian ekspresi VGCC berdasarkan hasil pemeriksaan *immunocytochemistry* (ICC) dengan reaksi antigen antibodi, ada 2 kategori, yaitu ekspresi VGCC (+) berarti kanal kalsium terbuka ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma atau ekspresi VGCC (-) berarti kanal kalsium tertutup ditandai dengan tidak berwarna coklat pada sitoplasmanya. Ekspresi VGCC yang diamati dihitung secara visual (dihitung lapangan pandang per 100 sel), dan apabila ada pewarnaan coklat pada spermatozoa berarti ekspresi VGCC (+) atau kanal kalsium terbuka, sedangkan bila tidak ada warna coklat pada sitoplasma spermatozoa berarti ekspresi VGCC (-) atau kanal kalsium tertutup, satuan persentase ekspresi VGCC terbuka dan tertutup, skala pengukuran rasio.
5. *Verapamil* adalah *calcium channel blockers/ calcium antagonist*bersifat menutup kanal Ca^{2+} , mempunyai ikatan afinitas tinggi dan ketertarikan dengan reseptor site pada VGCC dalam sel spermatozoa. Verapamil digunakan sebagai kontrol negatif untuk penelitian tahap ke dua yaitu menunjukkan proses penutupan kanal Ca^{2+} . Dosis yang digunakan : 100 μM , skala pengukuran rasio.
6. Progesteron menghasilkan pembukaan kanal Ca^{2+} yang menyebabkan selektif kation kanal berkurang sehingga dapat menginduksi reaksi akrosom pada spermatozoa mamalia dan manusia. Progesteron digunakan sebagai kontrol positif untuk penelitian tahap ke dua yaitu menunjukkan

proses pembukaan kanal Ca^{2+} . Dosis yang digunakan : 0,1 $\mu\text{g/mL}$.Skala pengukuran rasio.

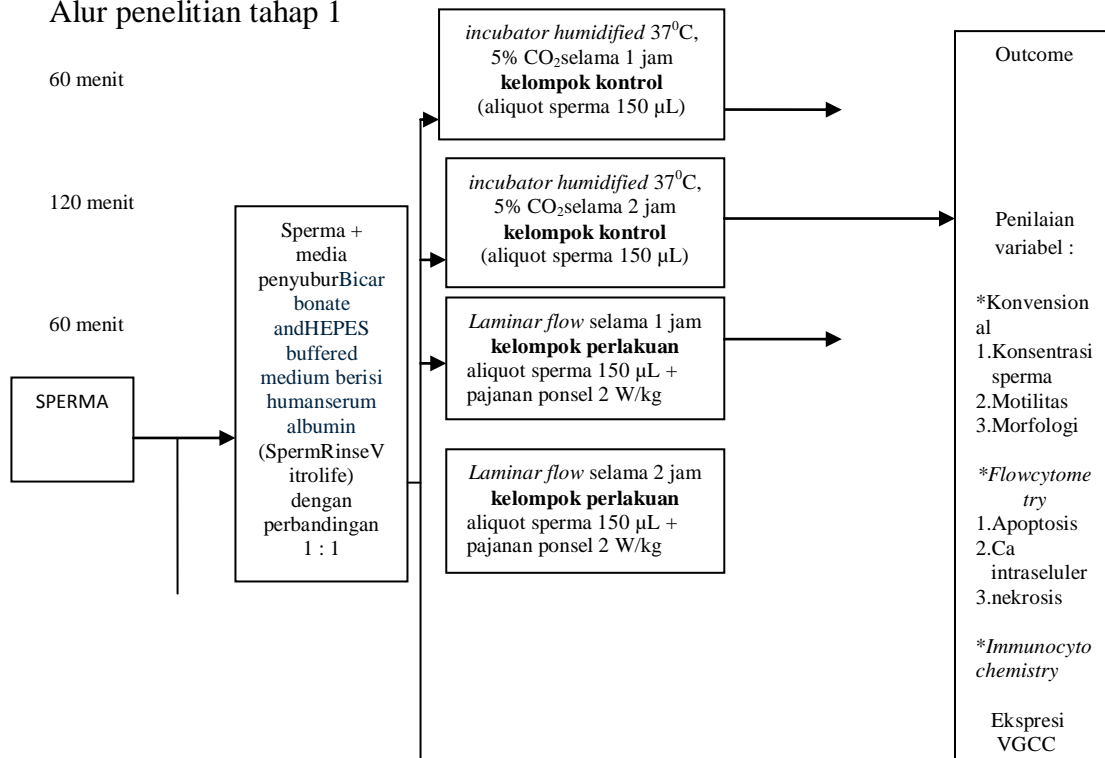
7. Thapsigargin adalah *inhibitor sarco-endoplasmic reticulum ATP-ase* yang menghambat pelepasan Ca^{2+} dari penyimpanan internal di retikulum endoplasma. Thapsigargin mempunyai efek hampir sama dengan verapamil digunakan sebagai kontrol negatif untuk penelitian tahap kedua dan dosis yang digunakan : 2 μM .Skala pengukuran rasio.

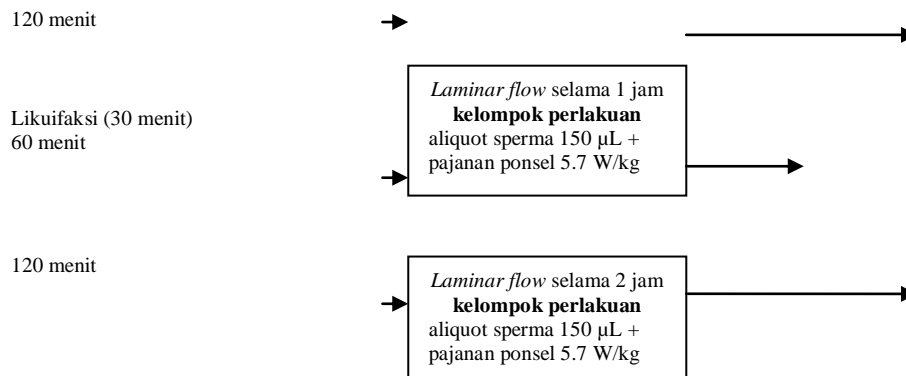
F. Alur Penelitian

Subyek penelitian berupa spermatozoa berasal dari donor sperma yang memiliki kriteria kualitas sperma sesuai WHO (1999) meliputi : konsentrasi sperma $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ dan bentuk morfologi normal $\geq 30\%$. Sampel semen yang sudah memenuhi kriteria tersebut ditempatkan dalam gelas ukur yang mengandung media washing bernutrisi *Bicarbonate and HEPES buffered medium* berisi human serum albumin (SpermRinse Vitrolife) dengan perbandingan 1 : 1. Aliquot sperma yang sudah homogen siap dipergunakan untuk penelitian. Pembagian kelompok dilakukan secara *random* dengan menggunakan mikropipet aliquot sperma diambil secara acak sebanyak 150 μL untuk setiap kelompok sehingga sampel terbagi menjadi 6 kelompok yaitu 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol tidak mendapatkan perlakuan apapun, sedangkan kelompok perlakuan mendapatkan perlakuan berupa pajanan radiasi ponsel secara akut dan kronik dengan SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg. Masing-masing diduplikasi 5. Sebelum penelitian dimulai sampel semen diperiksa terlebih dahulu kualitas dan fungsionalitas spermatozoa sebelum mendapat perlakuan apapun.

Pada bagan berikut ini (Gambar 11 dan 12) dijelaskan alur penelitian yang dikerjakan.

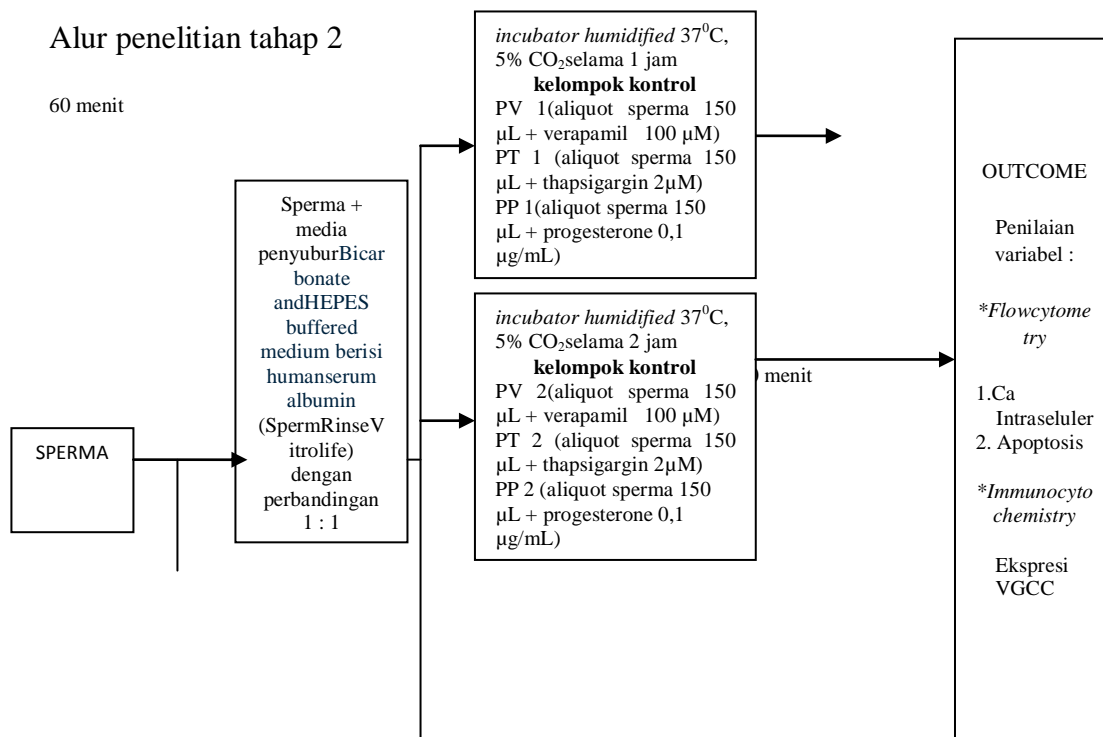
Alur penelitian tahap 1

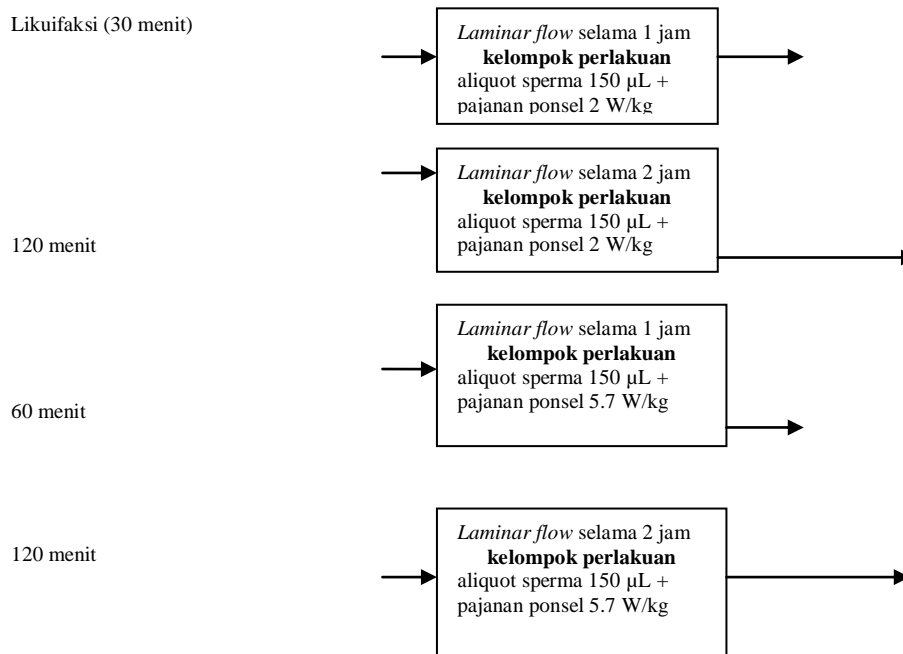




Gambar 11. Alur penelitian tahap 1

Alur penelitian tahap 2





Gambar 12. Alur penelitian tahap 2

Pengendalian bias pada saat penelitian :

- Pemeriksaan variabel penelitian berupa penghitungan kualitas spermatozoa (konsentrasi, motilitas, dan morfologi), dan ekspresi VGCC dilakukan oleh tiga pengamat terlatih, kemudian hasilnya di rata-rata, kecuali yang menggunakan alat *flowcytometer*.

- b. Supaya pajanan benar-benar berasal dari radiasi ponsel, maka pemberian pajanan dilakukan di tempat tertutup yang tidak ada pengaruh arus listriknya, sehingga untuk kelompok kontrol ditempatkan pada *incubator humidified* 37⁰C, 5% CO₂ (supaya sel spermatozoa tetap hidup memerlukan CO₂) sedangkan kelompok perlakuan ditempatkan di *laminar flow* (untuk menyesuaikan kondisi sel sperma bila ponsel diletakkan di saku celana secara *in vivo*).
- c. Untuk menentukan kriteria spermatozoa yang baik sesuai dengan panduan WHO (1999) yaitu : konsentrasi sperma $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ dan bentuk morfologi normal $\geq 30\%$.

G. Alat dan Bahan

1. Alat dan bahan pemeriksaan kualitas spermatozoa

Menggunakan metoda konvensional sesuai panduan WHO yaitu : *Improved Neubauer haemocytometer*, mikroskop cahaya *Olympus* seri BX 41, Camera digital DP-70, Software Olysia, obyek glassbeserta coverslip, gelas ukur, mikropipet, *dysposable syringe*, incubator humidified 37⁰C, 5% CO₂ dan *laminar flow*, *staining jar*, spermatozoa manusia, media spermaberupa media washing bernutrisi *Bicarbonate* dan *HEPES buffered* medium berisi human serum albumin(SpermRinse Vitrolife) dengan perbandingan 1 : 1, (SpermRinse), larutan NaCl, pengecatan HE, *inoculate petri dish* 60 buah.

2. Alat dan bahan pemeriksaan fungsionalitas spermatozoa

Annexin V Fluos labeling kit, larutan *propidium iodidium*(PI), larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS), larutan BSA, *Fluo-3 AM kit*, *petri dish well* untuk kultur

sebanyak 6 buah, ponsel dengan *Specific Absorption Rate* (SAR) 2 dan 5,7W/kg. Untuk kalibrasi, emisi radiasi ponsel diukur menggunakan *radiation electromagnetic detection*, tabung *flowcytometer*.

3. Alat dan bahan pembuatan preparat immunositokimia

Obyek gelas yang dilapisi *poly-L-lysine-coated*, *digital timer*, *refrigerator*, *microwave*, timbangan, progesterone 0.1 µg, Thapsigargin 2µM, Verapamil 100 µM, ethanol 50 %, 70 %, 80%, 90%, 95 % dan absolute, larutan H₂O₂, Tris EDTA, *CatSper primer antibody* (H-300), *Trekkie Universal link*, *secondary antibody HRP label*, xylol, Canada balsam.

H. Jalannya Penelitian

1. Penilaian sebelum penelitian

Memberi penjelasan kepada donor sebelum pengambilan sperma. Donor diberi penjelasan tentang tatacara pengumpulan, mengisi *inform consent*, dan aturan penelitian. Nama, masa abstinensi, dan waktu pengambilan dicatat. Semen diambil setelah abstinensi minimal 48 jam, dan tidak boleh lebih dari 7 hari (WHO, 1999). Spermatozoa donor dilakukan skrining kualitas sperma, apabila memenuhi kriteria WHO (1999) dijadikan sampel penelitian, kemudian diukur kualitas dan fungsionalitas spermatozoa sebelum perlakuan.

2. Penilaian pada masa perlakuan

Peneliti dibagi dalam 2 tahap, yaitu tahap pertama untuk mengungkapkan dampak radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa, dan tahap kedua untuk membuktikan bahwa radiasi ponsel

berpengaruh terhadap ekspresi VGCC pada proses penutupan kanal kalsium seperti yang tertera pada bagan alur penelitian (Gambar 11 dan 12).

a. Koleksi semen

Untuk penelitian *in vitro* ini, sampel semen didapatkan dari donor manusia, melalui skrening terlebih dahulu dan memenuhi kriteria yang ditentukan oleh WHO (1999), dengan cara masturbasi setelah 3-4 hari tidak melakukan hubungan seksual. Kontrol pengendalian agar benar-benar tidak melakukan hubungan seksual selama 3-4 hari dengan : donor berumur 20-25 tahun dan telah menandatangani *informed consent* bahwa akan mematuhi aturan penelitian. Semen ditampung dalam gelas ukur bermulut lebar. Volume semen didapatkan $\geq 4,0$ mL dan sampel semen dibiarkan mencair pada suhu 37°C , kemudian sampel semen dievaluasi sesuai dengan kriteria *World Health Organization* (WHO, 1999).

b. Persiapan sampel sperma

Volume sperma yang didapat setelah likuifaksi sebesar 5.0 mL dan diberi media washing bernutrisi *Bicarbonate* dan *HEPES buffered* medium berisi human serum albumin (Sperm Rinse Vitrolife) dengan perbandingan 1 : 1. Jumlah spermatozoa dihitung dengan *improved Neubauer Haemocytometer* dan konsentrasi spermatozoa yang digunakan penelitian bila $> 20 \times 10^6/\text{mL}$. Suspensi sperma ini, kemudian dibagi dalam 6 petri well 24 dengan masing-masing sumuran berisi 150 μL aliquot dan diduplikasi 5. Spesimen siap untuk digunakan dalam penelitian.

c. Pengukuran Konsentrasi Spermatozoa

Untuk mengukur konsentrasi spermatozoa digunakan metode konvensional sesuai panduan WHO (1999). Penghitungan jumlah spermatozoa menggunakan kotak kamar hitung *improved neubauer*. Aliquot sperma yang telah diaduk homogen selanjutnya ditambahkan larutan NaCl 0.9 % dan diaduk rata, kemudian ditetaskan di atas kotak kamar hitung *improved neubauer*, dan dilihat di bawah mikroskop serta dihitung menggunakan *stopwatch* sebanyak jumlah spermatozoa pada 25 kotak *improved neubauer* besar yang didalamnya masing-masing ada 16 kotak kecil.

d. Pemeriksaan motilitas spermatozoa

Pemeriksaan dapat dilakukan sejalan dengan pemeriksaan jumlah total spermatozoa sesuai panduan dari WHO (1999). Aliquot sperma 5 μ L ditetaskan di atas kamar hitung *improved neubauer*, kemudian dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 200-400 x, menghitung sebanyak 25 kotak besar. Menghitung kecepatan sperma pada bilik kecil dari garis ke garis (atas ke bawah atau kiri ke kanan) dengan gerakan lurus ke depan secara aktif dan lincah, disertai gerakan ekor yang teratur, dihitung dalam detik. Lapangan pandang diperiksa secara sistematis dan motilitas sperma yang dijumpai dicatat. Penghitungan harus mendapatkan 200 sperma secara berurutan yang kemudian diklasifikasikan sehingga menghasilkan persentase setiap kategori motilitas. Kategori yang dipakai untuk mengklasifikasi motilitas sperma menurut WHO (1999), sebagai berikut : *Fast progressive* (A) apabila sperma bergerak cepat progresif dan lurus ke depan, *Slow progressive* (B) apabila sperma bergerak lambat progresif, *Non-*

Progresive(C) apabila sperma bergerak tidak progresif, *Non-Motile*(D) apabila spermatozoa tidak bergerak.

e. Pemeriksaan morfologi spermatozoa

Pemeriksaan morfologi spermatozoa berdasarkan panduan WHO (1999). Aliquot sperma 5 μ L ditetaskan pada kaca objek. Membuat hapusan dengan cara mendorong larutan tersebut dengan kaca objek lain ke depan. Dibiarkan kering, kemudian difiksasi dengan alkohol 70 % dan dibiarkan mengering selama 15 menit. Kemudian diberi pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) dan dibiarkan mengering selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir perlahan dan dibiarkan kering. Pewarnaan dalam penelitian ini tidak menggunakan metode *Papanicolaou*, *Shorr* atau *Diff-Quik* dikarenakan keterbatasan waktu. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dalam beberapa lapangan pandang terhadap 200 sperma yang normal dan abnormal, dengan pembesaran 1000 kali dengan emersion oil, kemudian dilanjutkan penghitungan jumlah morfologi spermatozoa normal dan abnormal sesuai panduan WHO (1999). Ciri sperma normal mempunyai bentuk kepala oval dan ekor panjang lurus, sedangkan sperma yang abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan (*amorphous*), atau terlalu bengkok, dan ekornya tidak lurus bahkan tidak berekor, atau hanya terdapat ekornya saja tanpa kepala.

f. Pemeriksaan Apoptosis

Spermatozoa yang mengalami apoptosis diketahui dengan alat *Flowcytometry*. Untuk mendeteksi molekul intraseluler perlu membran sel dibuat permeabel terlebih dahulu agar probe yang digunakan dapat masuk ke dalam sel

dan berinteraksi dengan molekul sasaran. Untuk identifikasi antigen yang terdapat pada sel digunakan berbagai zat pewarna fluorokrom. Dalam penelitian ini menggunakan 2 zat warna fluorokrom yaitu *Fluorescent isothiocyanate* (FITC) yang memancarkan sinar kuning-hijau dengan emisi 515 nm dan *Propidium iodide* (PI) yang memancarkan sinar merah-orange dengan emisi 580 nm. Deteksi adanya sel apoptosis dilakukan berdasarkan *translokasi phosphatidyleserine* membran dengan menggunakan *Annexin-V-Fluos kit* dan *propidium iodid* (PI). Sampel semen berisi 1×10^6 spermatozoa dicuci dengan PBS dan disentrifugal pada $200 \times g$ selama 5 menit. Pelet sel diresuspensi dalam 100 μ L larutan *Annexin V-flous labeling* (berisi reagen *Annexin V-flous labeling* dalam 1 mL inkubasi *buffer* dan *propidium iodide* (PI) dalam Hepes buffer). Setelah inkubasi 15 - 25°C selama 10-15 menit, sel apoptosis dibedakan dari sel nekrotik berdasarkan pewarnaan (Tahmineh *et al.*, 2007). *Flowcytometry* dengan 15 mW air-cooled 488 nm argon-ion laser. Sinyal FL1 (FITC) mendeteksi melalui 530/30 nm band yang melewati filter, sinyal FL2 (PI) mendeteksi melalui 585/42 nm band yang melewati filter dan 20.000 kejadian dicatat.

Penggunaan kombinasi dua pewarnaan fluoresen yaitu Annexin V untuk mengidentifikasi sperma hidup, dan PI untuk mengidentifikasi sel mati atau sel dengan kerusakan membran. Sperma normal /hidup (negatif Annexin V dan PI), apoptosis awal (positif Annexin V dan negatif PI), apoptosis (positif Annexin V dan positif PI), nekrotik (negatif Annexin V dan positif PI).

g. Pengukuran Ca^{2+} intraseluler spermatozoa

Pengukuran Ca^{2+} di dalam sperma menggunakan Ca^{2+} probe *Fluo-3 AM* (Invitrogen F14218) sesuai prosedur dari pabrik. Intraseluler *Fluo-3 AM* dihidrolisa oleh *cytosolic esterases* menjadi fluoresen, sebagai bentuk sensitive Ca^{2+} . Stok larutan *Fluo-3 AM* terdapat dalam 1 mM *dimethyl sulfoxide* (DMSO) dan disimpan pada $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Untuk tiap analisis, larutan *Fluo-3* disiapkan dengan mencampur larutan stok dengan volume yang sama dari 8% *Pluronic* sampai konsentrasi akhir 0.5 mM *Fluo-3* dan 4% *Pluronic*. *Pluronic F-127* berasal dari 20% larutan DMSO (Invitrogen P300MP) dan larutan *Pluronic* (8%) disiapkan menggunakan 1 volume stok dan 1.5 volume DMSO.

Pewarnaan sperma dengan tabung 12 x 75 mm *polypropylene* dalam suasana aerobik (suhu $10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sperma pertama kali diberi 2 μL larutan *Fluo-3* sampai konsentrasi akhir 1 μM *Fluo-3* selama 15 menit. Sebelum analisis, 2 μL of PI working solution (Invitrogen, P-4170) ditambahkan di tiap sampel sampai konsentrasi akhir 4.8 μM untuk mengidentifikasi dan mengeluarkan sel yang mati dari analisis. Sel dianalisis dengan flowcytometer menggunakan 488 nm eksitasi dari 15 mW *air cooled* argon laser dengan detektor FL1 and FL3 menerima fluoresen hijau emisi dari *Fluo-3* dan fluoresen merah emisi dari PI. fluorescence λ_{ex} 482 nm; λ_{em} 608 nm (pH 7.2) dan λ_{ex} 540 nm; λ_{em} 608 nm (*bound to DNA*) (Guthrie et al., 2011). Sepuluh ribu kejadian sperma diseleksi.

h. Pengukuran ekspresi VGCC dengan pemeriksaan *immunocytochemistry* (ICC)

Aliquot sperma 5 μL di teteskan pada *slide glass* yang telah dilapisi *poly-L-lysine-coated*, dismear dan dibiarkan kering di udara selama 15 menit. *Slide glass* ditandai dengan pin pen untuk membatasi lokasi pengecatan preparat. *Slide*

glass difiksasi dengan methanol dingin pada suhu -20°C selama 10 menit (dimasukkan dalam kulkas). *Antigen retrieval* dengan memasukkan preparat dalam larutan Tris EDTA pada suhu 95°C selama 17 menit (di dalam *microwave*), kemudian didinginkan. Blok *endogenous peroxidase activity* dilakukan dengan menginkubasi preparat dalam larutan 3 % H_2O_2 dalam methanol selama 15 menit (diberi penutup berwarna hitam supaya tidak teroksidasi). Preparat dicuci dengan larutan PBS sebanyak dua kali masing-masing 3 menit dengan cara ditetesi. *Blocking non specific binding* dilakukan dengan memberikan *background sniper universal protein biocare* selama 10 menit.

Pemberian antibodi primer berupa *Rabbit CatSper antibody polyclonal H 300 sc 33153* 200 mg/mL (Santa Cruz USA) diencerkan dalam PBS berisi 1 % BSA yang diencerkan 50 kali, diinkubasi overnight pada suhu 4°C . Larutan 0.01 mol/L *phosphoric acid buffer* (PBS, pH 7.4) sebagai pengganti antibodi primer digunakan sebagai kontrol negatif (Hong-Gang Li *et al.*, 2006). Pemberian antibodi sekunder berupa *Trek Universal Link STU 00H Universal Secondary Antibody Biocare* yang diencerkan 100 kali selama 15 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan larutan PBS sebanyak satu kali selama 3 menit dengan cara ditetesi, yang preparat kontrol negatif disendirikan. Pemberian *Trek Avidin HRP STHRP 700 Streptavidin HRP* selama 10 menit. Preparat dicuci dengan larutan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama 3 menit dengan cara ditetesi, yang preparat kontrol negatif disendirikan. Visualisasi immunoreaktivitas dengan DAB 3,3 diaminobenzidine yang diencerkan 50 kali selama 5 menit. Dehidrasi bertahap dengan alkohol 50 % (1 menit), 70 % (1 menit), 80 % (1 menit),

90 % (1 menit), 95 % (1 menit), alkohol absolute (1 menit). Immersi dengan xylol 1 (3 menit), xylol 2 (3 menit), xylol 3 (3 menit). Mounting dengan *Canada balsam* dan coverslip, dikeringkan diudara.

Penilaian ekspresi VGCC berdasarkan hasil pemeriksaan imunositokimia ada 2 kategori, yaitu ekspresi VGCC (+) atau ekspresi VGCC (-).

- 1) Ekspresi VGCC (+) artinya VGCC terbuka (fase aktif), sehingga pada saat dilakukan penetesan antibody primer CatSper, antibody tersebut dapat masuk ke dalam intra sel dan berikatan dengan epitop yang terletak pada loop intra sel antara homolog domain III dengan homolog domain IV. Pada saat dilakukan penetesan DAB (pewarna) maka zat tersebut akan melekat pada ikatan antigen dan antibodi tersebut, sehingga cairan intra sel (sitoplasma) akan berwarna coklat.
- 2) Ekspresi VGCC (-) artinya VGCC inaktif (*closed*), sehingga pada saat dilakukan penetesan antibody primer CatSper, antibody tersebut tidak dapat masuk ke dalam intra sel dan tidak dapat berikatan dengan epitop yang terletak pada loop intra sel antara homolog domain III dengan homolog domain IV. Pada saat dilakukan penetesan DAB (pewarna) maka zat tersebut tidak akan melekat oleh karena tidak ada ikatan antigen dan antibodi tersebut, sehingga cairan intra sel (sitoplasma) tidak berwarna coklat.

I. Etika Penelitian

Dalam penelitian ini telah dilakukan prosedur yang terkait dengan etika penelitian terhadap subyek penelitian. Ijin penelitian diajukan ke komisi etik Fakultas Kedokteran UNS untuk mendapatkan pengesahan. Calon obyek penelitian mendapat penjelasan lengkap tentang tujuan, tata cara, keuntungan dan

kerugian penelitian. Calon obyek penelitian berhak untuk menyetujui atau menolak untuk menjadi peserta penelitian setelah mendapat penjelasan. Apabila bersedia, calon obyek penelitian diminta untuk menandatangani surat kesediaan berpartisipasi. Obyek penelitian diberi penjelasan penelitian dan *informed consent* secara tertulis. Peneliti akan memenuhi azaz kerahasiaan terhadap identitas dan hasil pemeriksaan terhadap obyek penelitian.

J. Teknik Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh dicatat dan diolah menggunakan program *Statistical Package for Social Science* seri 16 (SPSS 16). Data yang telah masuk dilakukan penyandian (*coding*) dan penyuntingan (*editing*) dengan menggunakan komputer.

1. Analisis variabel

Analisis ini digunakan untuk melihat sifat-sifat statistik dari masing-masing variabel yang diteliti, antara lain tentang sebaran, nilai tengah dan simpang baku. Hasil analisis dari sifat masing-masing variabel ini akan menjadi dasar dalam pengolahan data lebih lanjut.

2. Uji statistik

Analisis statistik digunakan untuk menilai perbedaan nilai rerata antar kelompok berdasarkan variabel penelitian digunakan One Way ANOVA test (uji parametrik). Syarat wajib menggunakan uji One Way ANOVA adalah distribusi data harus normal dan varians data juga harus sama (Dahlan, 2009). Apabila tidak memenuhi syarat, dilakukan transformasi data, dan bila tetap data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji statistik pengganti One Way ONAVA

yaitu menggunakan *Kruskal-Wallis*(uji non-parametrik).Jika hasil analisis statistik diperoleh nilai $p < 0.05$ maka terdapat perbedaan nilai rerata antar kelompok, sedangkan bila nilai $p > 0.05$ berarti tidak terdapat perbedaan rerata nilai antar kelompok. Apabila nilai $p < 0.05$ dilanjutkan dengan uji Post Hoc yaitu dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda.

Penelitian ini juga dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* dan hasilnya data terdistribusi normal, sedangkan varians data tidak sama, sehingga dilakukan transformasi data dan diuji lagi tetapi variansnya masih tetap tidak sama. Berdasarkan data di atas, uji statistik One Way ANOVA tidak bisa dilakukan, sehingga uji statistik menggunakan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis*. Hasil analisis statistik diperoleh nilai $p < 0.05$ maka terdapat perbedaan nilai rerata antar kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dilakukan uji post hoc dengan menggunakan uji *Mann Whitney*. Untuk menguji kekuatan hubungan ekspresi VGCC dengan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa digunakan uji statistik *Pearson correlation*.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorik dengan rancangan *pre-post test controlled group design*. Pada penelitian ini subyek penelitian berupa ejakulat spermatozoa dari seorang donor yang sudah mengalami skrening dari 15 donor yang ada dan sudah memenuhi kriteria WHO (1999) yaitu konsentrasi sperma $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ dan bentuk morfologi normal $\geq 30\%$. Aliquot spermatozoa dibagi secara random menjadi 6 kelompok, masing-masing duplikasi 5, diisi aliquot sebanyak 150 μL untuk tiap sumuran petri well-24 sehingga

jumlah sumurannya 30 (penelitian tahap 1). Pemberian pajananradiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponselsecara akut (1 jam) dan secara kronik (2 jam) sertadilakukan secara *in vitro* untuk membuktikan dampak radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa dan pada penelitian tahap 2, aliquot spermatozoa dibagi secara random menjadi 8 kelompok, masing-masing duplikasi 5, diisi aliquot sebanyak 150 μ L untuk tiap sumuran petri well-24 sehingga jumlah sumurannya 40 buah untuk membuktikan bahwa radiasi ponsel berperan dalam penutupan kanal kalsium spermatozoa.

1. Uji Normalitas

Untuk menentukan uji statistik yang dipergunakan dalam menganalisis perbedaan variabel penelitian pada kedua kelompok, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data dengan uji statistik *Kolmogorov-Smirnov* atau *Shapiro-Wilk*, didapatkan nilai $p > 0.05$ diasumsikan distribusi data normal, sedangkan variansnya ternyata tidak sama sehingga dilakukan transformasi data terlebih dahulu, kemudian diuji normalitas lagi dan ternyata variansnya tetap tidak sama. Berdasarkan uji normalitas, dari enam variabel yang diuji statistik menunjukkan nilai $p > 0.05$ diasumsikan data berdistribusi normal. Ringkasan hasil uji normalitas data tersebut ditampilkan pada Tabel 3, sedangkan hasil uji normalitas dan varians lengkap ditampilkan pada Lampiran. Berhubung syarat One Way ANOVA tidak terpenuhi maka untuk uji statistiknya menggunakan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis*. Hasil analisis statistik diperoleh nilai $p < 0.05$ maka terdapat perbedaan nilai rerata antar kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dilakukan uji post hoc dengan menggunakan uji *Mann Whitney*.

Tabel 3. Hasil Uji Normalitas Data Penelitian dengan Uji Statistik *Kolmogorov-Smirnov*

No	Variabel	SAR 2 W/kg (p)	Kontrol (p)	SAR 5.7 W/kg (p)	Kontrol (p)
1	Jumlah spermatozoa	0.630	0.369	0.889	0.863
2	Motilitas spermatozoa	0.992	0.273	0.549	0.833
3	Morfologi normal spermatozoa	0.314	0.787	0.754	0.967
4	Sel apoptosis spermatozoa	0.537	0.946	0.580	0.574
5	Ca intraseluler spermatozoa	0.123	0.200	0.200	0.200
6	Ekspresi VGCC	0.461	0.574	0.682	0.825

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pajanan radiasi elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa serta untuk membuktikan bahwa radiasi ponsel berperan dalam penutupan kanal kalsium spermatozoa, dengan melakukan pemeriksaan jumlah, motilitas, morfologi spermatozoa, sel apoptosis, Ca intraseluler dan ekspresi VGCC.

2. Pengaruh Pajanan Radiasi Gelombang Elektromagnetik Radiofrekuensi

Ponsel

a. Pengaruh pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kualitas spermatozoa manusia

Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel diduga mempunyai efek negatif terhadap kualitas spermatozoa. Pajanan radiasi ponsel diberikan secara akut (selama 1 jam) dan secara kronik (selama 2 jam) dengan besar intensitas SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg, kemudian untuk

mengetahui pengaruh pajanan radiasi tersebut dilakukan pemeriksaan analisis kualitas sperma sesuai standar WHO, yaitu pemeriksaan konsentrasi, motilitas dan morfologi spermatozoa.

- 1) Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap konsentrasispermatozoa manusia.

Pajanan radiasi ponsel diberikan secara akut dan kronik dengan besar intensitas SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg, kemudian diperiksa konsentrasi spermatozoa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hasil pemeriksaan konsentrasi spermatozoa ditampilkan pada Tabel 4. Berdasarkan uji *Kruskall Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann Whitney* terlihat pada Tabel 4 bahwa rerata konsentrasi spermatozoa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p < 0.05$ dimana rerata konsentrasi spermatozoa lebih rendah pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel dibanding kelompok kontrol.

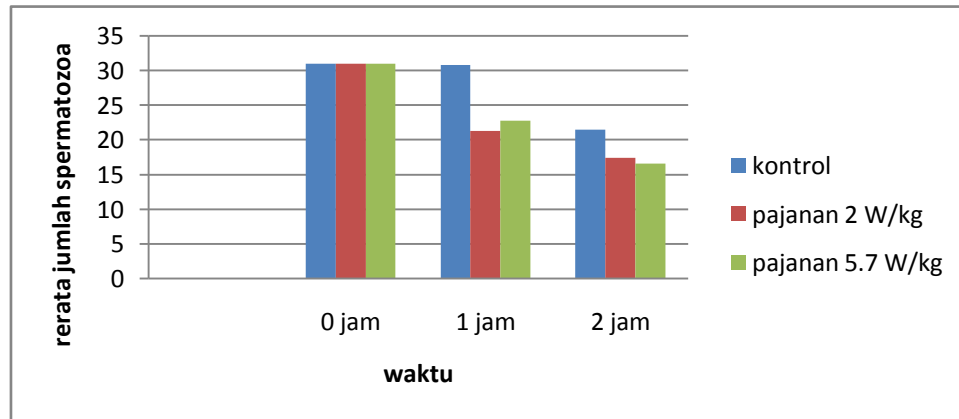
Tabel 4. Rerata konsentrasispermatozoa ($\times 10^6$ /mL) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu				p
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	30.91 ± 0.52	30.75 ± 2.04	21.47 ± 1.63	K-A 1 jam	$p < 0.009$
				K-A 2 jam	$p < 0.009$
A (Pajanan SAR 2 W/kg)	30.91 ± 0.52	21.29 ± 1.68	17.42 ± 1.80	A-B 1 jam	$p < 0.008$
				A-B 2 jam	$p > 0.375$
B (Pajanan SAR 5.7 W/kg)	30.91 ± 0.52	22.74 ± 1.93	16.62 ± 0.56	K-B 1 jam	$p < 0.009$
				K-B 2 jam	$p < 0.009$
				A 1-2 jam	$p < 0.016$
				B 1-2 jam	$p < 0.009$

Pada saat sebelum pajanan diberikan (0 jam), nilai rerata parameter tiga kelompok (kelompok kontrol, perlakuan pajanan 2 W/kg dan perlakuan pajanan 5.7 W/kg) pada penelitian ini hanya dihitung satu kelompok sebagai perwakilan dengan penghitungan dilakukan oleh 3 observer dan hasilnya dirata-rata sehingga hasil yang didapat relatif sama serta dengan mempertimbangkan keterbatasan waktu karena untuk mempersiapkan perlakuan intervensi berikutnya sehingga pada tabel tertera angka rerata sama di semua kelompok.

Pada pemeriksaan kualitas spermatozoa menggunakan cara konvensional subyektivitasnya tinggi, hal ini juga diakui oleh WHO (1999) sehingga peneliti berusaha mengurangi subyektivitas pemeriksaan dengan melibatkan 3 observer. Rerata konsentrasi spermatozoa kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), begitu pula untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$). Rerata konsentrasi spermatozoa sebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah $30.91 \pm 0.52 \times 10^6$ /mL, sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam ($30.75 \pm 2.04 \times 10^6$ /mL) maupun pada 2 jam ($21.47 \pm 1.63 \times 10^6$ /mL) lebih rendah dibanding rerata konsentrasi spermatozoa sebelum terpajan (0 jam). Rerata konsentrasi spermatozoa kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam ($21.29 \pm 1.68 \times 10^6$ /mL) maupun setelah terpajan 2 jam ($17.42 \pm 1.80 \times 10^6$ /mL) lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Rerata konsentrasi spermatozoa kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam ($22.74 \pm 1.93 \times 10^6$ /mL), maupun setelah

terpapar 2 jam ($16.62 \pm 0.56 \times 10^6$ /mL) lebih rendah dibanding rerata konsentrasi spermatozoa kelompok kontrol.



Gambar 13. Rerata konsentrasi spermatozoa yang terpapar radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu paparan 0,1 dan 2 jam

Rerata konsentrasi spermatozoa kelompok perlakuan yang mendapat paparan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$), namun tidak ada perbedaan pada paparan selama 2 jam ($p > 0.05$), hal ini dapat dikatakan bahwa pada lama waktu paparan 2 jam berpengaruh sama terhadap rerata konsentrasi spermatozoa baik pada dosis 2 W/kg maupun dosis 5.7 W/kg (Tabel 4).

2) Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap motilitas spermatozoa manusia.

Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa manusia. Motilitas spermatozoa dinilai berdasarkan pada standar WHO (1999) yaitu : *Fast progressive*(A) apabila sperma bergerak cepat progresif dan lurus ke depan, *Slow progressive*(B) apabila sperma bergerak lambat progresif, *Non-Progressive*(C)

apabila sperma bergerak tidak progresif, *Non-Motile*(D) apabila spermatozoa tidak bergerak.

Pada penelitian ini, kriteria *Fast progressive*(A) tidak terekspresi. Paparan radiasi ponsel diberikan secara akut dan kronik dengan besar intensitas SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg, kemudian diperiksa motilitas spermatozoa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa ditampilkan pada Tabel 5-7. Pada Tabel 5 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat paparan radiasi didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$). Pada kelompok kontrol (0 jam) terlihat bahwa angka pada tabel semua sama karena nilai parameter tiga kelompok (kelompok 0, 1 dan 2 jam) pada penelitian ini hanya dihitung satu kelompok sebagai perwakilan dengan penghitungan dilakukan oleh 3 observer dan hasilnya dirata-rata sehingga hasil yang didapat relatif sama serta dengan mempertimbangkan keterbatasan waktu karena untuk mempersiapkan perlakuan intervensi berikutnya.

Didapatkan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa lebih rendah pada kelompok yang terpapar radiasi dibanding kelompok kontrol. Rerata spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa kelompok yang terpapar radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), begitu pula untuk kelompok yang terpapar radiasi 5.7 W/kg

selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$)

diperlihatkan pada Tabel 5.

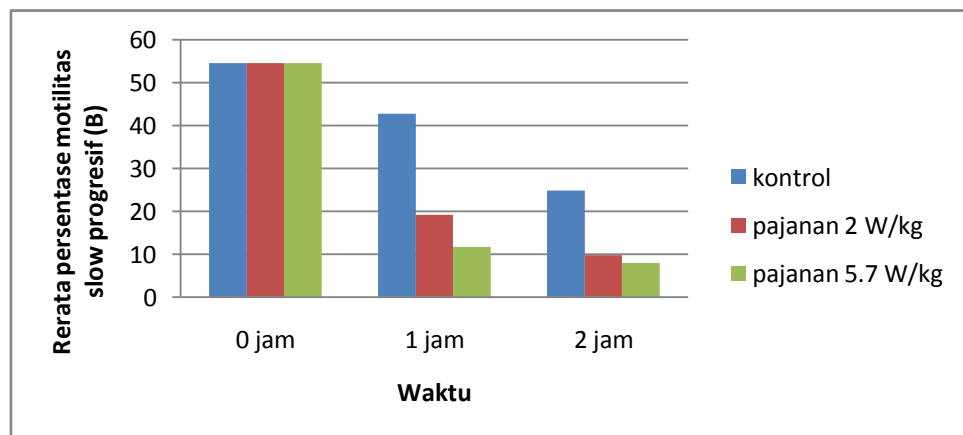
Tabel 5. Rerata persentase spermatozoa dengan motilitas kriteria *Slow Progressive*

(B) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	waktu				p
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	54.40± 2.30	42.80±3.56	24.80±1.30	K-A 1 jam	$p < 0.009$ $p < 0.007$
				K-A 2 jam	
A (pajanan SAR 2 W/kg)	54.40± 2.30	19.20±2.58	9.80±0.44	A-B 1 jam	$p > 0.060$ $p > 0.694$
				A-B 2 jam	
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	54.40± 2.30	11.80±7.08	8.00±1.00	K-B 1 jam	$p < 0.009$ $p < 0.008$
				K-B 2 jam	
				A 1-2 jam	$p < 0.007$ $p < 0.004$
				B 1-2 jam	

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa sebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 54.40±2.30, sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (42.80±3.56) maupun pada 2 jam (24.80±1.30) lebih rendah dibanding rerata spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa sebelum terpajan (0 jam). Rerata spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (19.20±2.58) maupun setelah terpajan 2 jam (9.80±0.44) lebih rendah dibanding

kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (11.80 ± 7.08), maupun setelah terpajan 2 jam (8.00 ± 1.00) lebih rendah dibanding rerata spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa kelompok kontrol.



Gambar 14. Rerata persentase spermatozoa dengan tingkatan motilitas kriteria *slow*

progressive (B) yang terpajan radiasi ponsel secara *in vitro* dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$), juga pada pajanan selama 2 jam ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa dengan lama waktu pajanan 1 jam berpengaruh sama terhadap rerata motilitas spermatozoa kriteria *slow progressive* (B) spermatozoa baik pada dosis 2 W/kg maupun pada dosis 5.7 W/kg (Tabel 5 dan Gambar 14).

Pada Tabel 6 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *non-progressive* (C) pada kelompok kontrol dan

kelompok perlakuan pajanan SAR 2 W/kg selama 1 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$), juga pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pajanan SAR 5.7 W/kg selama 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$). Sedangkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pajanan SAR 2 W/kg selama 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), juga pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pajanan SAR 5.7 W/kg selama 1 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) seperti terlihat pada Tabel 6.

Didapatkan rerata persentase motilitas spermatozoa kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol. Rerata motilitas spermatozoa kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), dan untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam juga didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

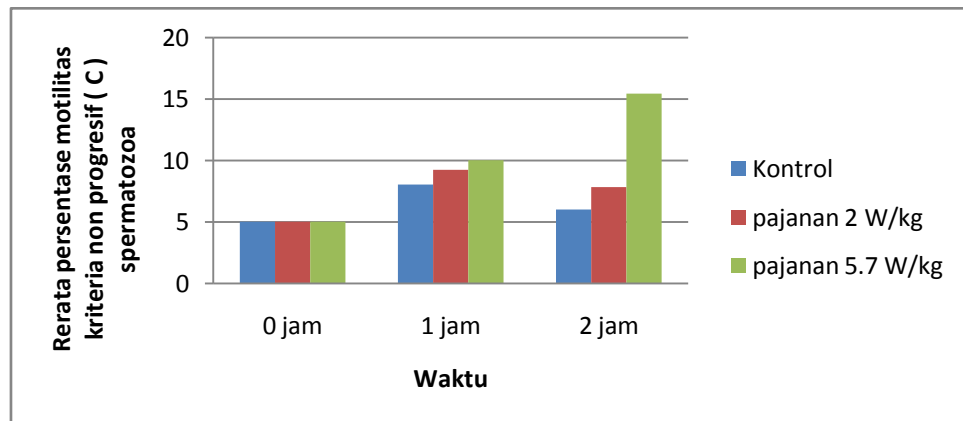
Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa sebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 5.00 ± 1.58 , sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (8.00 ± 2.54) maupun pada 2 jam (6.00 ± 1.58) lebih tinggi dibanding rerata motilitas spermatozoa kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa sebelum terpajan (0 jam).

Tabel 6. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *Non-Progressive* (C) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	waktu				p
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	5.00± 1.58	8.00±2.54	6.00±1.58	K-A 1 jam	p>0.833
				K-A 2 jam	p<0.009
A (paparan SAR 2 W/kg)	5.00± 1.58	9.20±2.58	7.80± 0.44	A-B 1 jam	p<0.008
				A-B 2 jam	p<0.035
B (paparan SAR 5.7 W/kg)	5.00± 1.58	10.00±1.58	15.40± 2.07	K-B 1 jam	p<0.009
				K-B 2 jam	p>0.751
				A 1-2 jam	p<0.044
				B 1-2 jam	p<0.012

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada paparan selama 1 jam (9.20 ± 2.58) maupun setelah terpajan 2 jam (7.80 ± 0.44) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (10.00 ± 1.58), maupun setelah terpajan 2 jam (15.40 ± 2.07) lebih tinggi dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa kelompok kontrol.

Adaperbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-progressive* (C) pada paparan selama 1 jam dan 2 jam dengan besar radiasi 2 W/kg dan 5.7 W/kg.



Gambar 15. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *Non-Progressive* (C) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam

Berdasarkan hasil penelitian ini dapatlah dikatakan bahwa besarnya dosis berpengaruh terhadap rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa, semakin besar intensitas radiasi ponsel, motilitas spermatozoa kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa semakin tinggi (Tabel 6 dan Gambar 15).

Pada Tabel 7 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile* (D) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$). Didapatkan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile* (D) spermatozoa lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol.

Tabel 7. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *Non-Motile*(D) terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

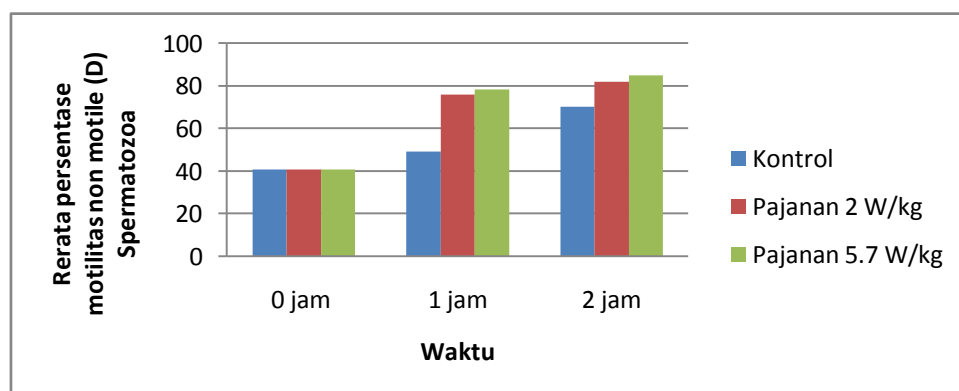
Kelompok	waktu				p value
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	40.60± 0.54	49.20±6.53	70.00±2.73	K-A 1	p<0.006
				jam	p<0.007
				K-A 2	
A (papanan SAR 2 W/kg)	40.60± 0.54	75.80± 0.44	81.60± 0.54	jam	
				A-B 1	p>0.299
				jam	p>0.062
B (papanan SAR 5.7 W/kg)	40.60± 0.54	78.20±4.81	84.60± 3.04	A-B 2	
				jam	
				K-B 1	p<0.008
				jam	p<0.008
				K-B 2	
				jam	
				A 1-2	p<0.006
				jam	p<0.036
				B 1-2	
				jam	

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile* (D)spermatozoa kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$), juga untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$).

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile* (D)spermatozoa sebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 40.60±0.54, sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (49.20±6.53) maupun pada 2 jam (70.00±2.73) lebih tinggi dibanding rerata motilitas spermatozoa kriteria *non-motile* (D)spermatozoa sebelum terpajan (0 jam). Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile*

(D)kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (75.80 ± 0.44) maupun setelah terpajan 2 jam (81.60 ± 0.54) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile* (D)kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (78.20 ± 4.81), maupun setelah terpajan 2 jam (84.60 ± 3.04) lebih tinggi dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile* (D)spermatozoa kelompok kontrol.

Rerata spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *non-motile* (D)spermatozoa kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$) juga pada pajanan selama 2 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$). Hal ini dapat dikatakan bahwa pada pajanan radiasi ponsel selama 1 jam dapat menyebabkan gangguan motilitas yang berakibat terjadinya peningkatan persentase motilitas sperma kriteria *non-motile* (D)atau spermatozoa yang tidak bergerak baik pada dosis pajanan 2 W/kg maupun 5.7 W/kg (Tabel 7 dan Gambar 16).



Gambar 16. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas dengan kriteria *Non-Motile* (D) yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam

3) Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap morfologi spermatozoa manusia

Pemeriksaan morfologi spermatozoa sesuai WHO (1999) berupa : morfologi normal, kelainan kepala, kelainan leher, kelainan ekor dan kelainan sitoplasma spermatozoa. Morfologi spermatozoa dikatakan normal apabila memiliki kepala berbentuk oval dengan bagian anterior pucat dan gelap di daerah posterior. Ekor sperma simetris terletak di dasar kepala, hanya satu ekor, tidak melingkar, sobek atau membungkuk di atas dirinya sendiri (WHO, 1999), ditampilkan pada gambar 17.

Pada tabel 8 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat paparan radiasi didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$). Didapatkan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal lebih rendah pada kelompok yang terpapar radiasi dibanding kelompok kontrol.



Gambar 17. Gambaran mikroskopis spermatozoa normal

Keterangan : kepala berbentuk oval dengan bagian anterior pucat dan gelap di daerah posterior. Ekor simetris terletak di dasar kepala, hanya satu ekor tidak melingkar..

Pewarnaan HE, Pembesaran 1000 x dengan emersion oil

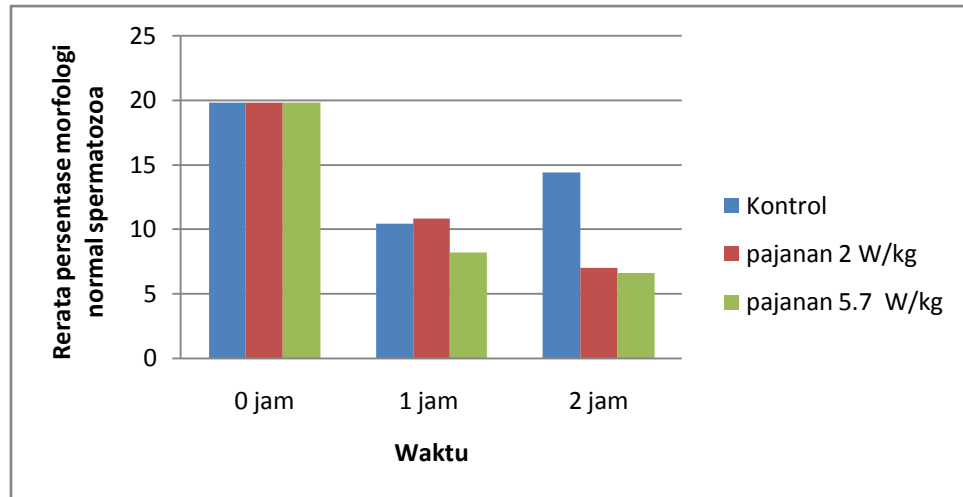
Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p>0.05$), juga untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p>0.05$). Hal ini dapat dikatakan bahwa dengan pajanan selama 1 jam, dapat menurunkan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal baik dengan dosis pajanan 2 W/kg maupun 5.7 W/kg.

Tabel 8. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu				p value
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	19.80±	10.40±	14.40±	K-A 1 jam	p<0.009
	1.30	0.89	0.54	K-A 2 jam	p<0.009
A (pajanan SAR 2 W/kg)	19.80±	10.80±	7.00±	A-B 1 jam	p>0.395
	1.30	5.11	1.58	A-B 2 jam	p>0.740
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	19.80±	8.20±3.96	6.60±	K-B 1 jam	p<0.009
	1.30		2.07	K-B 2 jam	p<0.009
				A 1-2 jam	p>0.248
				B 1-2 Jam	p>0.402

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal sebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 19.80±1.30, sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (10.40± 0.89) maupun pada 2 jam (14.40± 0.54) lebih rendah dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal sebelum terpajan (0 jam). Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (10.80±5.11) maupun setelah terpajan 2 jam (7.00±1.58) lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang

mempunyai morfologi normal kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (8.20 ± 3.96), maupun setelah terpajan 2 jam (6.60 ± 2.07) lebih rendah dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal kelompok kontrol.



Gambar 18. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0,1 dan 2 jam

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$) juga pada pajanan selama 2 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$). Lama waktu pajanan 1 jam berpengaruh terhadap penurunan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal, baik dengan dosis 2 W/kg maupun 5.7 W/kg (Tabel 8 dan Gambar 18).

Pada Tabel 9 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi kepala pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi tidak didapatkan perbedaan yang

bermakna ($p>0.05$). Didapatkan rerata persentase spermatozoayang mempunyai kelainan morfologi kepala lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi kepala kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p>0.05$), juga untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p>0.05$). Hal ini dapat dikatakan bahwa kelainan morfologi kepala dalam penelitian ini tidak disebabkan karena pengaruh pajanan radiasi ponsel secara *in vitro*.

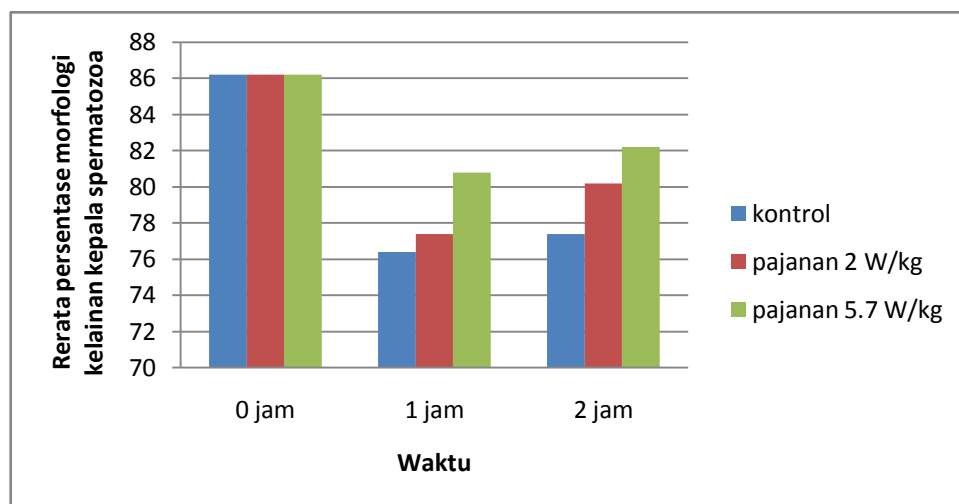
Rerata persentase spermatozoayang mempunyai kelainan morfologi kepalasebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 76.20 ± 5.89 , sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (76.40 ± 2.07) maupun pada 2 jam (77.40 ± 3.36) lebih tinggi dibanding rerata persentase morfologi kelainan kepalaspermatozoa sebelum terpajan (0 jam), meskipun tidak ada perbedaan secara signifikan.

Tabel 9. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi kepala terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu			p value	
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	76.20 ± 5.89	76.40 ± 2.07	77.40 ± 3.36	K-A 1 jam	$p>0.094$
				K-A 2 jam	$p>0.209$
A (pajanan SAR 2 W/kg)	76.20 ± 5.89	76.40 ± 8.17	80.20 ± 6.37	A-B 1 jam	$p>0.475$
				A-B 2 jam	$p>0.740$
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	76.20 ± 5.89	80.80 ± 6.01	82.20 ± 2.77	K-B 1 jam	$p>0.248$
				K-B 2 jam	$p>0.462$
				A 1-2	$p>0.753$
				jam B 1-2 jam	$p>0.675$

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi kepala kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (77.40 ± 8.17) maupun setelah terpajan 2 jam (80.20 ± 6.37) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi kelainan kepala kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (80.80 ± 6.01), maupun setelah terpajan 2 jam (83.20 ± 2.77) lebih tinggi dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi kepala kelompok kontrol.

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi kepala kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$) juga pada pajanan selama 2 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$).



Gambar 19. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi kepala terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam

Kelainan morfologi spermatozoa pada kepala yang didapatkan pada saat penelitian antara lain kecil, berbentuk buah pir (*pyriform*), *pin head* atau kepala mikro (Gambar 20).

Pada Tabel 10 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoadengan kelainan morfologi leher pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$). Didapatkan rerata persentase spermatozoadengan kelainan morfologi leher lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol.

Rerata persentase spermatozoadengan kelainan morfologileher kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), namun untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Rerata persentase spermatozoadengan kelainan morfologilehersebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 0.60 ± 0.54 , sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (3.80 ± 1.30) maupun pada 2 jam (1.00 ± 0.00) lebih tinggi dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi lehersebelum terpajan (0 jam).

Rerata persentase spermatozoa dengan kelainan morfologi leher kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (8.00 ± 2.54) maupun setelah terpajan 2 jam (1.60 ± 0.54) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, tetapi pada pajanan 1 jam tampak kelainan leher yang didapat sangat tinggi dibanding pada pajanan 2 jam hal ini dikarenakan ketiga observer berbeda

lapangan pandang yang dilihat sehingga setelah hasil pemeriksaan di rata-rata hasilnya menjadi tinggi.

Tabel 10. Rerata persentase spermatozoayang mempunyai kelainan morfologi leher terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu			p value
	0 jam	1 jam	2 jam	
K (Kontrol)	0.60±	3.80±1.30	1.00±	K-A 1 jam
	0.54		0.00	K-A 2 jam
A (pajanan SAR 2 W/kg)	0.60±	8.00±	1.60±	A-B 1 jam
	0.54		0.54	A-B 2 jam
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	0.60±	2.20±1.30	2.00±	K-B 1 jam
	0.54		0.00	K-B 2 jam
				A1 - 2 jam
				B1 - 2 jam

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (2.20±1.30), maupun setelah terpajan 2 jam (2.00±0.00) lebih tinggi dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher kelompok kontrol.

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) namun pada pajanan selama 2 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$). Hal ini dapat dikatakan bahwa pada lama pajanan 2 jam berpengaruh terhadap peningkatan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher, baik pada dosis 2 W/kg maupun dosis 5.7 W/kg (Tabel 10 dan Gambar 21).

Pada Tabel 11 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$). Didapatkan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$), namun untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p>0.05$).

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor sebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 3.20 ± 0.44 , sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (5.00 ± 1.58) maupun pada 2 jam (9.60 ± 0.54) lebih tinggi dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor sebelum terpajan (0 jam).

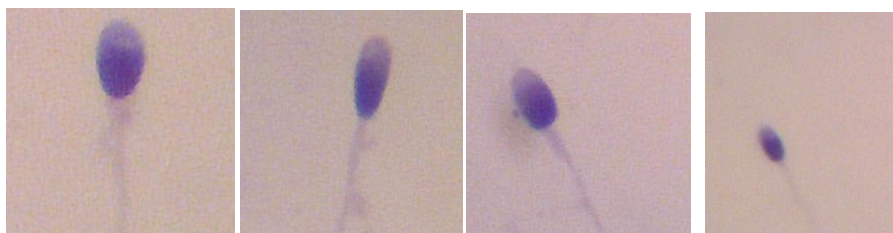
Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (5.80 ± 0.83) maupun setelah terpajan 2 jam (11.20 ± 4.14) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol.

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (8.20 ± 0.44), maupun setelah terpajan 2 jam (9.80 ± 0.44) lebih tinggi dibanding rerata

persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor kelompok kontrol.

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) namun pada pajanan selama 2 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$). Lama waktu pajanan 2 jam berpengaruh terhadap peningkatan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor baik pada pemberian dosis 2 W/kg maupun pada dosis 5.7 W/kg. (Tabel 11 dan Gambar 22).

Kelainan spermatozoa morfologi pada ekor yang didapatkan pada saat penelitian antara lain pendek, ganda (*multiple*), jepit rambut, patah, membungkuk atau ekor digulung atau kombinasi dari kelainan lainnya. Ekor bebas/lepas dan melingkar (Gambar 20).

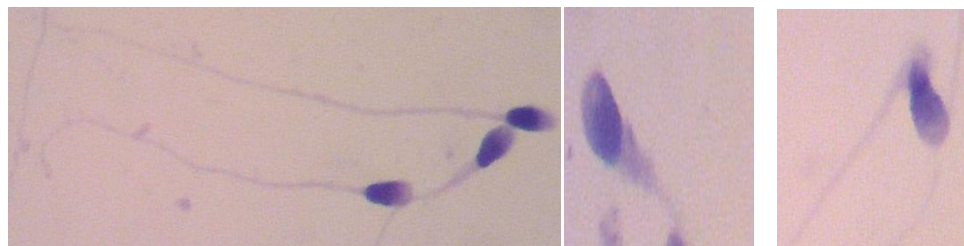


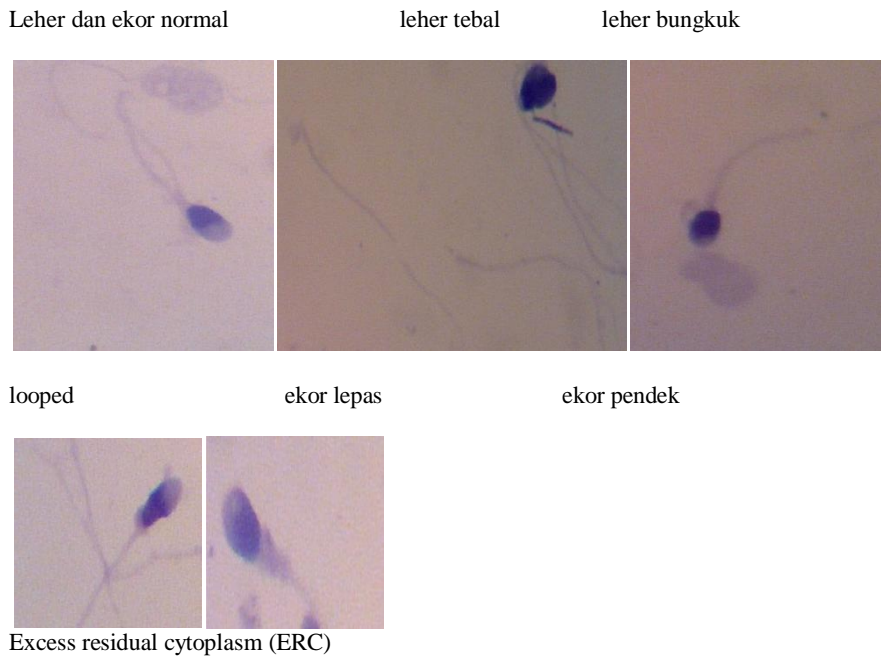
Kepala normal

pyriform

pyriform

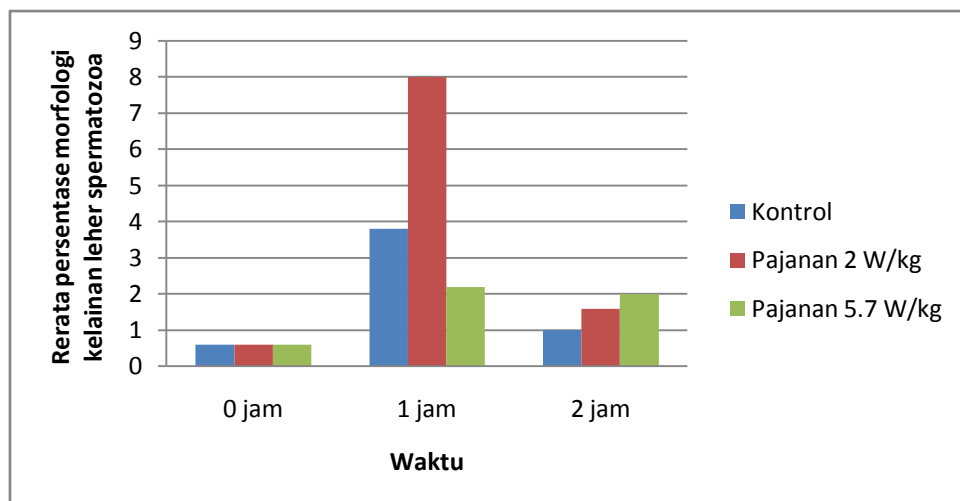
kecil





Gambar 20. Gambaran mikroskopik morfologi abnormal pada spermatozoa

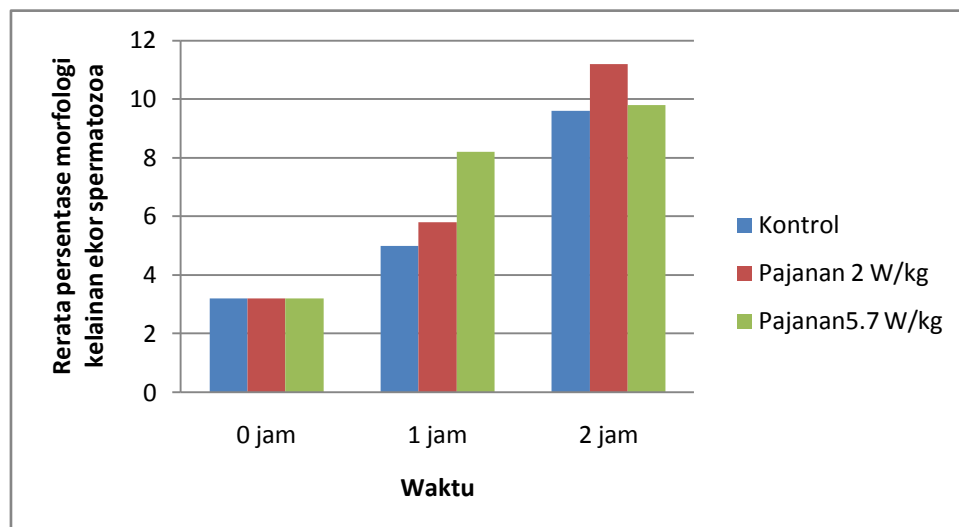
Keterangan : Gambaran mikroskopik morfologi abnormal pada kepala, leher dan ekor spermatozoa, Pewarnaan HE, Pembesaran 1000 x dengan emersion oil



Gambar 21. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi kelainan leher yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0,1 dan 2 jam

Tabel 11. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi ekor yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu			p value	
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	3.20±	5.00±1.58	9.60±	K-A 1 jam	p<0.007
	0.44		0.54	K-A 2 jam	p<0.007
A (pajanan SAR 2 W/kg)	3.20±	5.80±	11.20±	A-B 1 jam	p<0.000
	0.44	0.83	4.14	A-B 2 jam	p>0.146
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	3.20±	8.20±	8.80±	K-B 1 jam	p<0.005
	0.44	0.44	0.44	K-B 2 jam	p<0.005
				A 1-2 jam	p<0.026
				B 1-2 jam	p>0.072



Gambar 22. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi kelainan ekor

terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam

Kelainan spermatozoa morfologi pada sitoplasma yang didapatkan pada saat penelitian tampak spermatozoa dengan sitoplasma lebih dari 1/3 bagian kepala.

Pada Tabel 12 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$).

Didapatkan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$), juga untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$).

Tabel 12. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu			p value
	0 jam	1 jam	2 jam	
K (Kontrol)	0.20±	4.40±1.38	2.40±	K-A 1 jam
	0.34		0.34	K-A 2 jam
A (pajanan SAR 2 W/kg)	0.20±	1.00±	0.00±	A-B 1 jam
	0.34	0.23	0.00	A-B 2 jam
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	0.20±	0.60±	0.40±	K-B 1 jam
	0.34	0.14	0.64	K-B 2 jam
				A 1-2 jam
				B 1-2 jam

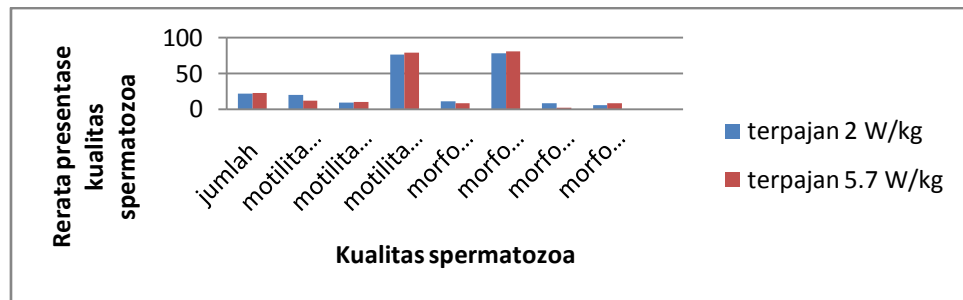
Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma sebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 0.20±0.34, sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (4.40±1.38) maupun pada 2 jam (2.40± 0.34) lebih tinggi dibanding rerata persentase

spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma sebelum terpajan (0 jam). Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (1.00 ± 0.23) lebih tinggi dibanding kontrol, sedangkan yang terpajan 2 jam (0.00 ± 0.00) lebih rendah dibanding kelompok kontrol.

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (0.60 ± 0.14), maupun setelah terpajan 2 jam (0.40 ± 0.64) lebih tinggi dibanding rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma kelompok kontrol.

Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) juga pada pajanan selama 2 jam ada perbedaan secara signifikan ($p < 0.05$). Hal ini berarti lama waktu pajanan dan besarnya dosis berpengaruh terhadap rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma, semakin lama dan semakin besar intensitas radiasi ponsel, rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi sitoplasma semakin tinggi (Tabel 12).

Semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia. Pada pajanan 2 W/kg selama 1 jam lebih baik kualitas spermatozoa dibanding yang mendapat pajanan satu jam dengan pajanan 5.7 W/kg radiasi ponsel (Gambar 23).



Gambar 23. Rerata persentase kualitas spermatozoa yang terpajan radiasi ponsel secara *in vitro* selama 1 jam

Gambar di atas menunjukkan bahwa semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia (Gambar 23).

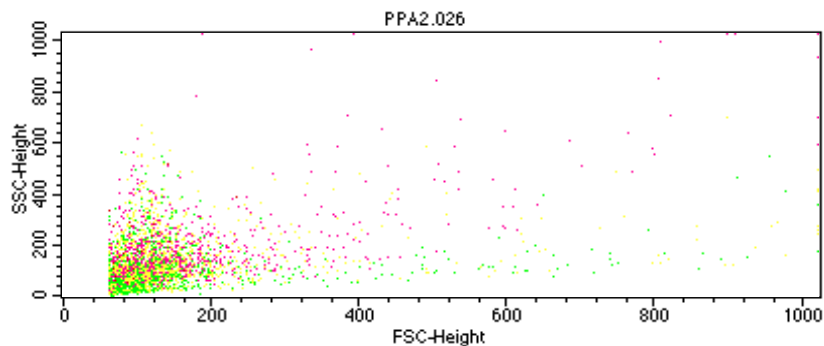
b. Pajanan Radiasi Gelombang Elektromagnetik Radiofrekuensi Ponsel terhadap Fungsionalitas Spermatozoa Manusia

1) Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap rerata persentase spermatozoa yang mengalami apoptosis

Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel diduga mempunyai pengaruh terhadap fungsionalitas spermatozoa, untuk mengetahui pengaruh tersebut dilakukan pemeriksaan dengan alat *flowcytometer* guna menentukan rerata persentase spermatozoa yang mengalami apoptosis dan rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa. Pemeriksaan spermatozoa dengan menggunakan *flowcytometer* baru pertama kali dilaksanakan di laboratorium Patologi Klinik FK UGM sehingga memerlukan optimasi cara pemeriksaan relative lama. Pada pemeriksaan sel apoptosis menggunakan *flowcytometer* di dapatkan analisis gambaran sebagai berikut :

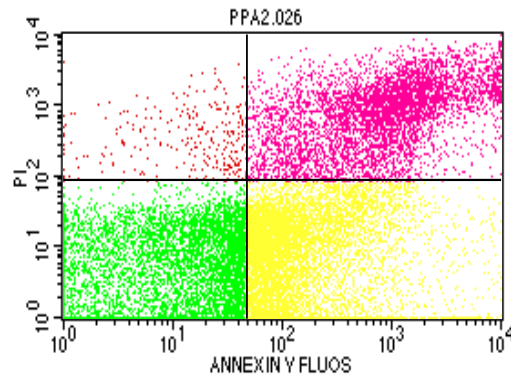
- a) Untuk analisis apoptosis, yang dilihat pada gated % pada *Lower Right* (LR)
- b) *Lower left* (LL) : sel hidup; *Lower right* (LR) : sel apoptosis; *Upper Left* (UL) dan *Upper Right* (UR) : sel apoptosis lanjut, nekrosis akibat apoptosis.
- c) Region 1 (R1) : pemisahan antara sel sperma dan sel lain; Region 2 (R2) : sperma yang hidup; Region 3 (R3) : sel sperma yang apoptosisdalam %

Salah satu hasil analisis *flowcytometer* ditampilkan di bawah ini.



Gambar 24. Hasil analisis *flowcytometry* populasi spermatozoa di Regio 1.

Keterangan : populasi spermatozoa masih bercampur dengan sel lain seperti leukosit, debris, dan sebagainya.



Quad	% Gated	% Total
UL	1.47	1.47
UR	25.55	25.55
LL	33.66	33.66
LR	39.32	39.32

Gambar 25. Hasil analisis *flowcytometersel* apoptosis dengan Annexin V Fluos

dan Propidium iodidium (PI). Keterangan : selapoptosis sperma ditunjukkan pada LR (warna kuning =early apoptosis), LL (warna hijau =sel sperma hidup), UL dan UR (warna merah = nekrosis akibat apoptosis).

PadaTabel 13 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mengalami apoptosis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$). Didapatkan rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase jumlahspermatozoa yang mengalami apoptosis kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$), juga untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan

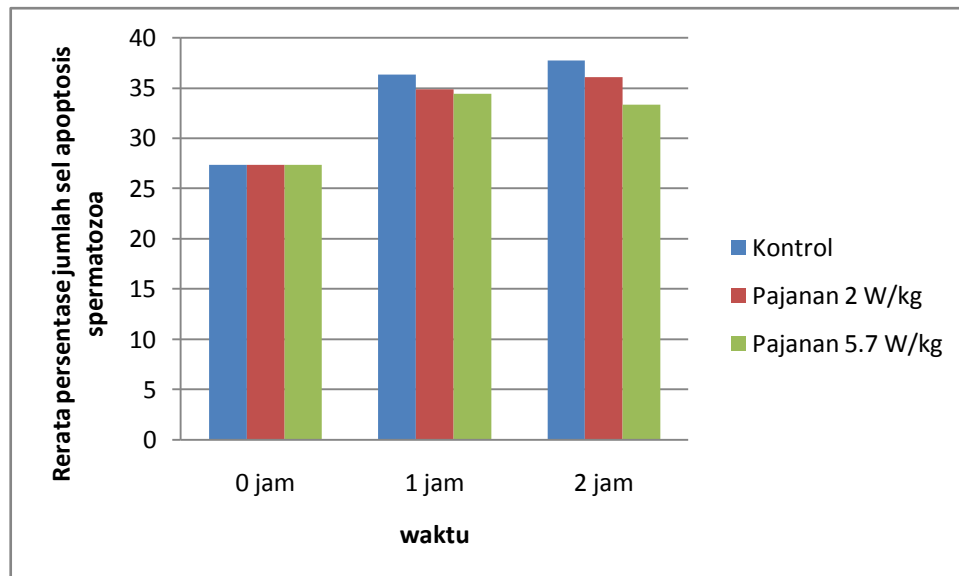
bahwa durasi waktu 1 jam pajanan radiasi berpengaruh terhadap jumlah sel spermatozoa yang mengalami apoptosis baik pada kelompok kontrol, pajanan 2 W/kg dan 5.7 W/kg.

Tabel 13. Rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis terpapar radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu			p value
	0 jam	1 jam	2 jam	
K (Kontrol)	27.35± 3.87	36.30±2.94	37.68±3.21	K-A 1 jam p<0.028 K-A 2 jam p<0.009
A (pajanan SAR 2 W/kg)	27.35± 3.87	34.87± 3.33	36.08± 3.31	A-B 1 jam p>0.805 A-B 2 jam p>0.128
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	27.35± 3.87	34.40± 2.42	33.29±1.59	K-B 1 jam p<0.008 K-B 2 jam p<0.008 A1 – 2 jam p>0.465 B1 – 2 jam p>0.464

Rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis sebelum terpapar (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 27.35±3.87, sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (36.30±2.94) maupun pada 2 jam (37.68±3.21) lebih tinggi dibanding rerata persentase jumlah sel apoptosis spermatozoa sebelum terpapar (0 jam). Rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis kelompok yang terpapar 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (34.87±3.33) maupun setelah terpapar 2 jam (36.08±3.31) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis

kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (34.40 ± 2.42), maupun setelah terpajan 2 jam (33.29 ± 0.59) lebih tinggi dibanding rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis kelompok kontrol.



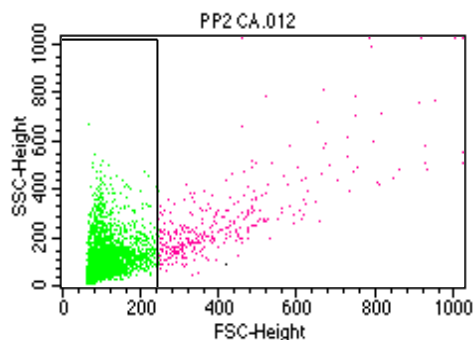
Gambar 26. Rerata persentase spermatozoa yang mengalami apoptosis terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam

Rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$) juga pada pajanan selama 2 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$) (Tabel 13 dan Gambar 26).

2) Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa manusia

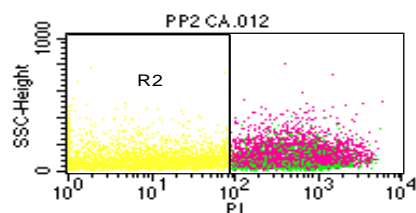
Pada penelitian ini merupakan bagian dari tahap penelitian kedua yaitu untuk membuktikan bahwa pajanan radiasi ponsel dapat menghambat penutupan kanal kalsium sehingga apabila terjadi hambatan berupa proses penutupan kanal

kalsium maka jumlah Ca^{2+} intraseluler juga akan berkurang. Pemeriksaan spermatozoa dengan menggunakan *flowcytometer* baru pertama kali dilaksanakan di laboratorium Patologi Klinik FK UGM sehingga memerlukan optimasi relative lama dan pada pemeriksaan jumlah Calsium intraseluler menggunakan *flowcytometer* di dapatkan analisis gambaran yang dapat dilihat pada gated % R2. Sedangkan pada Region 1 (R1) : sel dipisahkan antara sel sperma dengan sel leukosit,debris, dan sebagainya; Region 2 (R2) : sperma yang hidup; Region 3 (R3) : sperma yang mati.Salah satu hasil analisis flowcytometer ditampilkan pada gambar 27, 28 dan 29.



Gambar 27. Hasil analisis *flowcytometry* populasi spermatozoa di Regio 1.

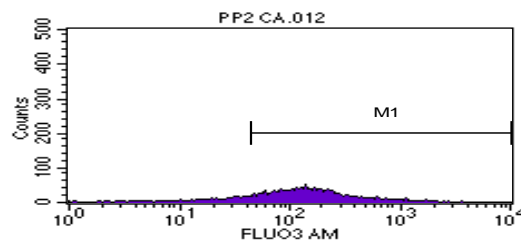
Keterangan : populasi spermatozoa masih bercampur dengan sel lain
seperti leukosit, debris, dan sebagainya.



Region	% Gated	% Total
R1	100.00	91.38
R2	39.84	36.41
R3	68.91	62.97

Gambar 28. Hasil analisis *flowcytometry* populasi spermatozoa di Regio 2.

Keterangan : R2 berisi sperma yang hidup, R3 berisi sperma yang mati.



Sample ID: PP2 CA
Acquisition Date: 18-Dec-14
Gate: G2
Total Events: 20000

Marker	% Gated	% Total
All	100.00	36.41
M1	85.79	31.24

Gambar 29. Hasil analisis *flowcytometer* Calsium intraseluler dengan Fluo-3 AM

dan Propidium iodidium (PI).

Keterangan : konsentrasi jumlah Calsium

intraseluler sel sperma yaitu M1 = 85.79 % dari (R2) 39.84 % (sel hidup) = 34.18 %

Pada Tabel 14 terlihat bahwa rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi hasil uji statistiknya bervariasi. Didapatkan perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol dengan pajanan 2 W/kg selama 1 jam ($p < 0.05$), sedangkan pada pajanan 2 jam tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$). Kelompok kontrol dengan kelompok pajanan 5.7 W/kg selama 1 jam terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), sedangkan pada pajanan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa dengan pajanan selama 1 jam dapat mempengaruhi rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa baik pada dosis 2 W/kg maupun dosis 5.7 W/kg. Kelompok pajanan 2 W/kg dengan kelompok verapamil selama 1 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$) begitu pula pada pajanan selama 2

jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p>0.05$). Hal ini juga terdapat pada kelompok pajanan 5.7 W/kg dengan kelompok verapamil. Pada kelompok thapsigargin selama 1 dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p>0.05$) dengan kelompok yang mendapat pajanan radiasi 2 W/kg maupun pada pajanan 5.7 W/kg. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah kalsium intraseluler kelompok verapamil tidak ada perbedaan/sama dengan kelompok yang mendapat pajanan radiasi 2 W/kg maupun 5.7 W/kg. Pada kelompok pajanan radiasi 2 W/kg maupun 5.7 W/kg dengan kelompok progesterone selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p<0.05$).

Rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoasebelum terpajan (0 jam) pada kelompok kontrol adalah 52.89 ± 19.89 , sedangkan hasil pemeriksaan baik pada 1 jam (74.75 ± 2.54) maupun pada 2 jam (71.02 ± 0.67) lebih tinggi dibanding rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa sebelum terpajan (0 jam). Rerata persentase jumlah kalsium interseluler spermatozoa kelompok yang terpajan 2 W/kg baik pada pajanan selama 1 jam (74.78 ± 0.47) maupun setelah terpajan 2 jam (72.42 ± 0.82) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol (71.02 ± 0.67). Rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok yang terpajan 5.7 W/kg baik setelah terpajan 1 jam (71.93 ± 0.52), maupun setelah terpajan 2 jam (71.78 ± 0.45) hampir sama dibanding rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok kontrol (71.02 ± 0.67).

Rerata jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok verapamil pada saat terpajan 1 jam (74.62 ± 1.13) hampir sama dengan kontrol

(74.75 ± 2.54) dan setelah terpajan 2 jam (73.12 ± 2.04) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol (71.02 ± 0.67), sedangkan rerata jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok thapsigargin baik pada saat terpajan 1 jam (70.65 ± 2.61) maupun setelah terpajan 2 (68.95 ± 0.77) jam lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (71.02 ± 0.67).

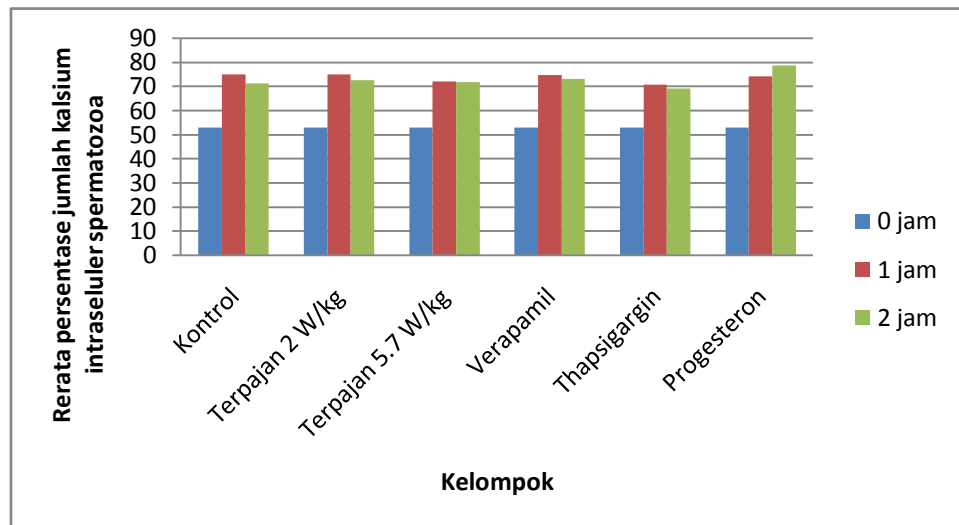
Rerata jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok progesterone terjadi hal yang sebaliknya, yaitu pada saat terpajan 1 jam (74.00 ± 0.76) hampir sama dengan kelompok kontrol (74.75 ± 2.54) tetapi setelah terpajan 2 jam (78.62 ± 1.05) lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (71.02 ± 0.67).

Rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) namun pada pajanan selama 2 jam tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa tidak tergantung dosis pajanan pada lama pajanan 2 jam, hal ini berarti sudah terjadi penutupan kanal kalsium akibat pajanan radiasi ponsel sehingga tidak ada kalsium yang dapat masuk ke dalam spermatozoa lagi pada pajanan 2 jam.

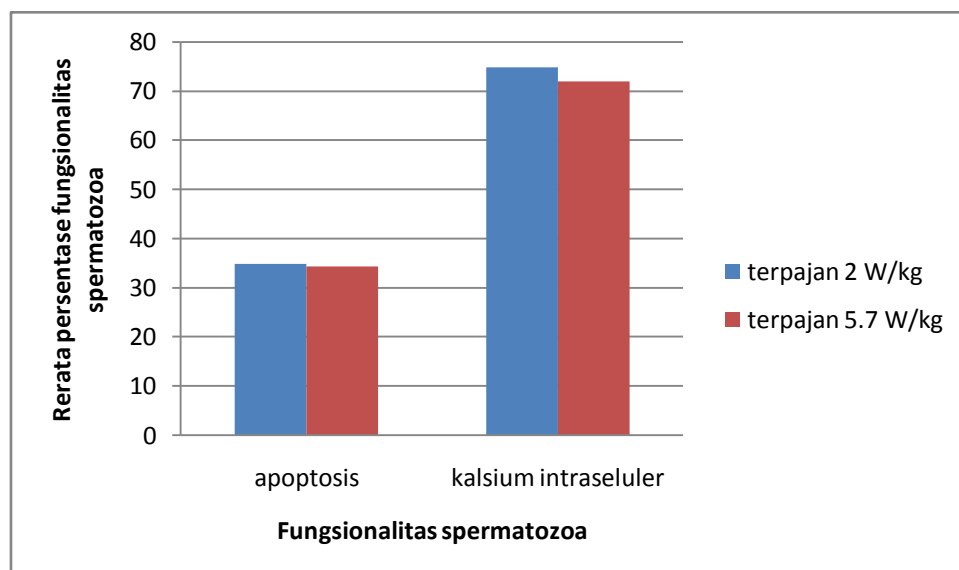
Tabel 14. Rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa yang terpajan radiasi ponsel pada kondisi *in vitro*

Kelompok	Waktu			p value	
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol)	52.89±	74.75±2.54	71.02±	K-A 1 jam	p<0.009
	19.89		0.67	K-A 2 jam	p>0.076
A (pajanan SAR 2 W/kg)	52.89±	74.78±	72.42±	A 1-2 jam	p<0.009
	19.89	0.47	0.82	B 1-2 jam	p>0.624
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	52.89±	71.93±	71.78±	K-B 1 jam	p>0.116
	19.89	0.52	0.45	K-B 2 jam	p>0.116
C (+ Verapamil)	52.89±	74.62 ±	73.12	A-B 1 jam	p<0.000
	19.89	1.13	± 2.04	A-B 2 jam	p>0.163
D (+ Thapsigargin)	52.89±	70.65 ±	68.95	C-A 1 jam	p>0.924
	19.89	2.61	± 0.77	C-A 2 jam	p>0.120
E (+ Progesteron)	52.89±	74.00 ±	78.62	C-B 1jam	p>0.641
	19.89	0.76	± 1.05	C-B 2 jam	p>0.230
				D-A 1 jam	p>0.361
				D-A 2 jam	p>0.102
				D-B 1 jam	p>0.548
				D-B 2 jam	p>0.120
				E-A 1 jam	p<0.002
				E- A2 jam	p<0.008
				A1-2 jam	p<0.009
				B1-2 jam	p>0.402
				E-B 1jam	p<0.032
				E-B 2jam	p<0.003

Semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah fungsionalitasspermatozoa manusia. Pada pajanan 2 W/kg selama 1 jam lebih baik fungsionalitas spermatozoa dibanding yang yang mendapat pajanan 5.7 W/kg radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel.



Gambar 30. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kalsium intraseluler terpapaj radiasi ponsel pada kondisi *in vitro* dengan waktu pajanan 0, 1 dan 2 jam



Gambar 31. Rerata persentase fungsionalitas spermatozoa yang terpapaj radiasi ponsel secara *in vitro* selama 1 jam

c. Pengaruh Paparan Radiasi Gelombang Elektromagnetik Radiofrekuensi Ponsel terhadap Ekspresi Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) pada Spermatozoa sebagai Pembuktian Proses Penutupan Kanal Kalsium

Penelitian tahap kedua ini untuk membuktikan bahwa paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel mempunyai pengaruh terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa, sehingga untuk mengetahui pengaruh tersebut dilakukan pemeriksaan secara *Immunocytochemistry* (ICC). Pemeriksaan spermatozoa manusia secara *Immunocytochemistry* (ICC) baru pertama kali dilaksanakan di Laboratorium Histologi FK UGM, sehingga memerlukan waktu relatif lama untuk melakukan optimasi cara pembuatan preparatnya.

Penilaian ekspresi VGCC berdasarkan hasil pemeriksaan ICC ada 2 kategori, yaitu ekspresi VGCC (+) artinya VGCC terbuka (fase aktif), sehingga pada saat dilakukan penetesan antibodiprimer CatSper, antibodi tersebut dapat masuk ke dalam intra sel dan berikatan dengan epitop yang terletak pada loop intra sel antara homolog domain III dengan homolog domain IV. Pada saat dilakukan penetesan DAB (pewarna) maka zat tersebut akan melekat pada ikatan antigen dan antibodi tersebut, sehingga cairan intra sel (sitoplasma) akan berwarna coklat.

Ekspresi VGCC (-) artinya VGCC inaktif (*closed*), sehingga pada saat dilakukan penetesan antibodiprimer CatSper, antibodi tersebut tidak dapat masuk ke dalam intra sel dan tidak dapat berikatan dengan epitop yang terletak pada loop intra sel antara homolog domain III dengan homolog domain IV. Pada saat dilakukan penetesan DAB (pewarna) maka zat tersebut tidak akan melekat oleh

karena tidak ada ikatan antigen dan antibodi tersebut, sehingga cairan intra sel (sitoplasma) tidak berwarna coklat. Pada gambar 32, terlihat seluruh sitoplasma berwarna coklat yang merata pada bagian kepala, leher dan ekor spermatozoa yang menandakan pewarnaan pada kanal kalsium (VGCC).



A

B

Gambar 32. Gambar mikroskopis spermatozoa manusia

Keterangan :

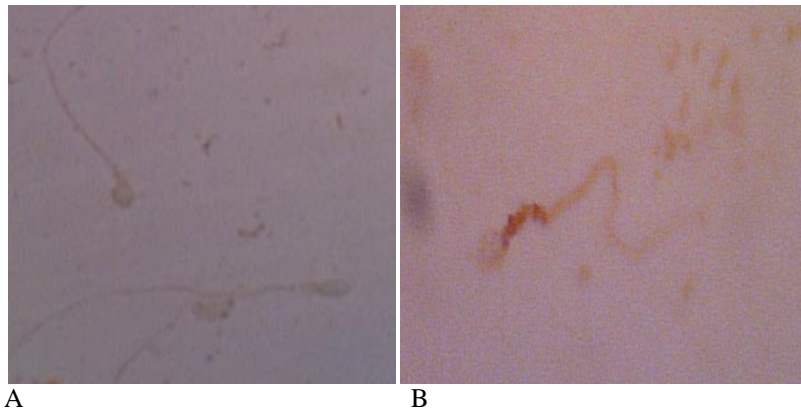
A. Gambaran mikroskopis ekspresi VGCC pada spermatozoa kelompok kontrol positif

(dengan pemberian antibodi CatSper)

B. Gambaran mikroskopis ekspresi VGCC pada spermatozoa kelompok kontrol positif (dengan pemberian Progesteron)

Tanda panah menunjukkan ekspresi VGCC (+) tampak sitoplasma berwarna coklat merata pada dinding kepala, leher dan ekor spermatozoa yang menandakan ekspresi VGCC (+) artinya VGCC fase aktif (membuka).

Pewarnaan dengan teknik immunositokimia (ICC), pembesaran 1000 x mikroskop cahaya dan emersion oil.



A

B

Gambar 33. Gambar mikroskopis spermatozoa manusia

Keterangan :

A. Gambaran mikroskopis ekspresi VGCC pada spermatozoa kelompok yang terpajan 2 W/kg selama 1 jam.

B. Gambaran mikroskopis ekspresi VGCC pada spermatozoa kelompok yang terpajan 2 W/kg selama 2 jam.

Ekspresi VGCC (-) tampak sitoplasma tidak berwarnacoklat pada dinding kepala, leher

dan ekor spermatozoa yang menandakan ekspresi VGCC (-) artinya VGCC fase inaktif (menutup). Pewarnaan dengan teknik immunositokimia (ICC), pembesaran 1000 x mikroskop cahaya dan emersion oil.



A

B

Gambar 34. Gambar mikroskopis spermatozoa manusia

Keterangan :

A. Gambaran mikroskopis ekspresi VGCC pada spermatozoa kelompok yang terpajan 5.7 W/kg selama 1 jam.

B. Gambaran mikroskopis ekspresi VGCC pada spermatozoa kelompok yang terpajan 5.7 W/kg selama 2 jam.

Ekspresi VGCC (-) tampak sitoplasma tidak berwarnacoklat pada dinding kepala, leher

dan ekor spermatozoa yang menandakan ekspresi VGCC (-) artinya VGCC fase inaktif (menutup). Pewarnaan dengan teknik immunositokimia (ICC), pembesaran 1000 x mikroskop cahaya dan emersion oil.

Pada Gambar 34 adalah hasil pemeriksaan immunositokimia dimana ekspresi VGCC (-). Tidak dijumpai sitoplasma sel spermatozoa yang berwarna coklat. Pada Tabel 15 terlihat bahwa rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa pada kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi 2 W/kg dan 5.7 W/kg tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$), berarti antara kelompok kontrol negatif dan kelompok yang mendapat pajanan radiasi mempunyai rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa yang sama. Begitu juga antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok thapsigargin dan verapamil ($p > 0.05$). Kelompok kontrol negatif dengan kelompok progesteron didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), berarti antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok progesterone mempunyai rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa yang berbeda ditandai dengan adanya peningkatan rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC sebesar 57-62 setiap 100 sel spermatozoa. Didapatkan rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa hampir sama pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol negatif.

Rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$), juga untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam juga didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

Rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) juga pada pajanan selama 2 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$). Lama waktu pajanan dan besarnya dosis berpengaruh terhadap rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa, semakin lama dan semakin besar intensitas radiasi ponsel, rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap 100 sel spermatozoa semakin rendah kecuali pada kontrol yang mendapat progesterone (Tabel 15 dan Gambar 35).

Hal ini menunjukkan bahwa pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dapat menurunkan ekspresi VGCC positif sehingga dapat dikatakan bahwa pajanan radiasi ponsel menyebabkan VGCC (-) sesuai hasil pada kelompok yang mendapat intervensi verapamil dimana verapamil berfungsi sebagai *blocker* kanal kalsium.

Berdasarkan data di atas dapat dikatakan bahwa ada perbedaan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa yang mendapat intervensi pajanan radiasi ponsel, verapamil, thapsigargin, dan progesterone, dimana pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menurunkan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa manusia.

Tabel 15. Rerata persentase spermatozoa yang mengekspresikan VGCC pada setiap

100 sel spermatozoa pada kondisi *in vitro* dengan pemeriksaan ICC

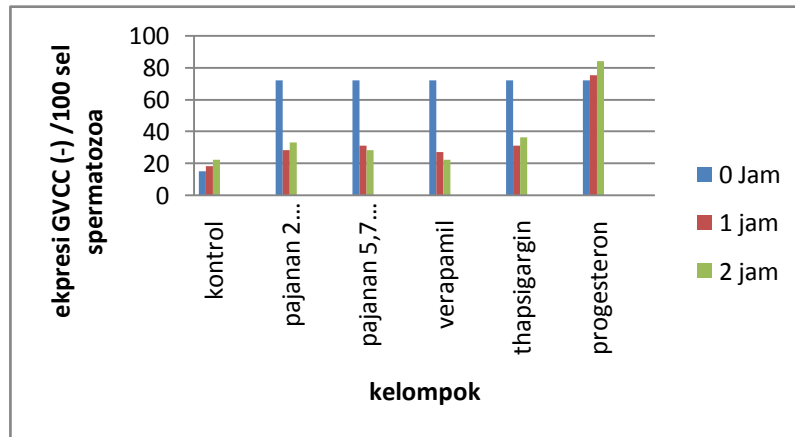
Kelompok	Waktu			p value	
	0 jam	1 jam	2 jam		
K (Kontrol) (-)	15.67± 3.45	18.05 ± 0.47	22.20 ± 2.28	K(-)-A 1 jam	p>0.104 p>0.072
				K(-)-A 2 jam	
A (pajanan SAR 2 W/kg)	72.98 ± 1.22	28.40±1.67	33.00± 1.00	A 1-2 jam	p<0.001
				B1-2 jam	p<0.014
B (pajanan SAR 5.7 W/kg)	72.98 ± 1.22	31.60±	28.80±1.09	K (-)-B1 jam	p>0.250 p>0.068
		1.67		K(-)-B 2 jam	
C (+ Verapamil)	72.98 ± 1.22	27.10±	22.80 ± 1.09	A-B 1 jam	p<0.003
		1.02		A-B 2 jam	p<0.000
D (+ Thapsigargin)	72.98 ± 1.22	31.60±1.67	36.80± 1.09	C-A 1 jam	p>0.063
				C-A 2 jam	p>0.079
E (+ Progesteron)	72.98 ± 1.22	75.00±0.70	84.40 ± 0.89	C 1-2 jam	p<0.031
				C-B 1 jam	p>0.101
				C-B 2 jam	p>0.231
				D-A 1 jam	p>0.340
				D-A 2 jam	p>0.270
				D-B 1 jam	p>0.170
				D-B 2 jam	p>0.200
				E-A 1 jam	p<0.002
				E-A 2 jam	p<0.030
				E-B 1 jam	p<0.019
				E-B 2 jam	p<0.022
				E 1-2 jam	p<0.000

Ket : K negative = kelompok spermatozoa yang tidak diberi antibody CatSper, A= kelompok spermatozoa yang mendapat pajanan radiasi 2 W/kg, B = kelompok spermatozoa yang mendapat pajanan radiasi 5.7 W/kg,C= kelompok spermatozoa yang mendapat intervensi verapamil, D= kelompok spermatozoa yang mendapat intervensi thapsigargin, E= kelompok spermatozoa yang mendapat intervensi progesterone, VGCC (-) menutup atau fase pasif.

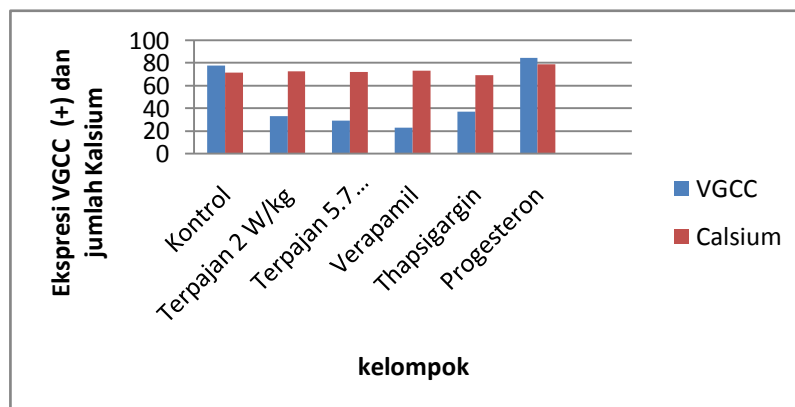
Berdasarkan Gambar 36, dapatlah diketahui bahwa ekspresi VGCC meningkat sesuai dengan pembukaan kanal kalsium seperti yang dimiliki kelompok progesteron dimana progesteron bersifat dapat membuka kanal kalsium.

Begitu juga sebaliknya, ekspresi VGCC dihambat karena adanya penutupan kanal

kalsium seperti yang ditampilkan oleh kelompok verapamil.



Gambar 35. Rerata persentase spermatozoa yang mempunyai ekspresi VGCC/100 sel pada kondisi *in vitro* dengan pemeriksaan ICC dan waktu pajanan 0,1 dan 2 jam



Gambar 36. Rerata persentase ekspresi VGCC (+) dan Kalsium intraseluler pada berbagai kelompok

Hubungan spermatozoa yang mengekspresi VGCC dengan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa ditampilkan dalam Tabel 16.

Tabel 16. Hubungan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) dengan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa

Hubungan antar variabel	Signifikansi (nilai p)	Kekuatan hubungan (r)
Ekspresi VGCC dengan jumlah sel	0.003	0.361
Ekspresi VGCC dengan motilitas B	0.000	0.664
Ekspresi VGCC dengan motilitas C	0.844	- 0.025
Ekspresi VGCC dengan motilitas D	0.000	- 0.660
Ekspresi VGCC dengan morfologi normal	0.000	0.634
Ekspresi VGCC dengan morfologi kelainan kepala	0.957	0.007
Ekspresi VGCC dengan morfologi kelainan leher	0.403	- 0.101
Ekspresi VGCC dengan morfologi kelainan ekor	0.008	- 0.324
Ekspresi VGCC dengan kalsium intraseluler	0.102	- 0.205
Ekspresi VGCC dengan apoptosis	0.039	0.257
PPA1 dengan PPB 1	0.003	0.983
PPA 2 dengan PPB2	0.700	- 0.238
PPA1 dengan PPA 2	0.001	0.990
PPB1 dengan PPB 2	0.907	- 0.073

Ket : PPA= kelompok spermatozoa yang mendapat pajanan radiasi 2 W/kg, PPB = kelompok spermatozoa yang mendapat pajanan radiasi 5.7 W/kg. Ekspresi VGCC berarti fase aktif atau kanal terbuka.

Ada hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa dengan kualitas spermatozoa (jumlah sel $p=0.003$; $r=0.361$; motilitas B $p=0.000$; $r=0.664$; motilitas D $p=0.000$, $r= -0.660$; morfologi normal $p=0.000$; $r=0.634$; morfologi kelainan ekor $p=0.008$, $r= -0.324$) dan fungsionalitas spermatozoa (apoptosis $p=0.039$; $r=0.257$) setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel. Artinya semakin banyak ekspresi VGCC di dapat berarti semakin banyak kanal kalsium yang bersifat terbuka, sehingga semakin baik kualitas (jumlah sel, morfologi,motilitas) dan fungsionalitas (apoptosis, Ca intraseluler) spermatozoanya. Sedangkan hubungan

apoptosis dengan kualitas spermatozoa diuji dengan menggunakan *Pearson*

Correlation, dan didapatkan data pada Tabel 17.

Tabel 17. Hubungan apoptosis dengan kualitas spermatozoa

Hubunga antar variabel	Signifikansi (p)	Kekuatan hubungan (r)
Apoptosis dengan jumlah sperma	0.851	- 0.024
Apotosis dengan motilitas jenis B	0.638	0.059
Apotosis dengan motilitas jenis C	0.046	0.348
Apotosis dengan motilitas jenis D	0.404	- 0.105
Apoptosis dengan morfologi normal	0.067	0.228
Apoptosis dengan morfologi kelainan kepala	0.826	- 0.028
Apoptosis dengan morfologi kelainan leher	0.733	0.043
Apoptosis dengan morfologi kelainan ekor	0.080	- 0.219
Apoptosis dengan Ca intraseluler	0.006	0.339

Berdasarkan Tabel 17, terdapat hubungan antara apoptosis dengan motilitas jenis C ($p=0.046$, $r= 0.348$) dan antara apoptosis dengan Ca intraseluler ($p=0.006$, $r= 0.339$).

B. Pembahasan

Telepon selular (ponsel) adalah bagian penting dari setiap kehidupan modern manusia, dan diperlukan penelitian untuk mengevaluasi konsekuensi dari meningkatnya penggunaan *smartphone*. Beberapa penelitian menunjukkan hubungan antara penggunaan ponsel dan infertilitas pria (Agarwal *et al.*, 2009; Baste *et al.*, 2008; Wdowiak *et al.*, 2007). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat pengaruh pajanan radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa manusia dengan menghitung konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa serta menghitung jumlah sel apoptosis dan jumlah Ca

intraseluler spermatozoa. Selain itu, juga untuk mengetahui apakah pajanan radiasi ponsel mempengaruhi ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa.

Penghitungan konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa serta penghitungan jumlah sel apoptosis dan jumlah Ca intraseluler serta ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) dilakukan pada saat sebelum pajanan diberikan (0 jam), satu (1) jam sebagai pajanan akut dan pada dua (2) jam sebagai pajanan kronik radiasi ponsel. Pada kontrol 0 sebelum diberi pajanan, nilai rerata parameter variabel tiga kelompok (kelompok kontrol, kelompok mendapat pajanan 2 W/kg dan kelompok mendapat pajanan 5.7 W/kg) sama di semua kelompok karena peneliti hanya menghitung satu kelompok sebagai perwakilan dengan alasan penghitungan dilakukan oleh 3 observer dan hasilnya dirata-rata sehingga hasil yang didapat relatif sama serta dengan mempertimbangkan keterbatasan waktu penelitian karena untuk mempersiapkan perlakuan intervensi berikutnya.

Penelitian ini dikelompokkan dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan rancangan *pre-post test controlled group design*. Uji normalitas data penelitian dilakukan dengan uji statistik *Kolmogorov Smirnov* dan data terdistribusi normal pada semua kelompok tetapi varians data tidak sama (Tabel 3). Berhubung tidak memenuhi syarat uji statistik ANOVA, peneliti menggunakan uji non parametrik berupa uji *Kruskall-Wallis*, dan apabila hasilnya $p < 0.05$ dilanjutkan dengan analisis post hoc dengan uji *Mann-Whitney*.

1. Pengaruh pajanan ponsel terhadap kualitas spermatozoa

Kualitas spermatozoa menurun karena pengaruh pajanan radiasi ponsel, hal ini dapat diketahui melalui mekanisme *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Oxidative stress* di induksi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) menyebabkan kerusakan spermatozoa. Jika ROS melebihi kadar antioksidan dalam tubuh, kelebihannya akan menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan–kerusakan sel yang disebut stres oksidatif. Tingginya ROS menyebabkan kerusakan spermatozoa, yang berakhir dengan infertilitas. Membran plasma spermatozoa mengandung *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA) yang mudah dirusak oleh ROS. Kadar ROS yang berlebihan menyebabkan disfungsi spermatozoa karena terjadinya peroksidasi lipid dan perubahan fungsi membran yang berakibat terhadap penurunan metabolisme spermatozoa, morfologi sperma, motilitas sperma dan fertilitas (Hamada *et al.*, 2011). ROS menyebabkan gangguan spermiogenesis sehingga dapat menghasilkan morfologi spermatozoa yang abnormal (Hamada *et al.*, 2011).

a. Pengaruh pajanan ponsel terhadap konsentrasi spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa cenderung menurun sebanding dengan bertambah lama penggunaan ponsel yaitu lama waktu pajanan akut (1 jam) dan pajanan kronik (2 jam) serta besarnya dosis (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg) (Gambar 13).

Rerata konsentrasi spermatozoa kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg selama 1 jam berbeda secara signifikan ($p < 0.05$), namun tidak ada perbedaan pada pajanan selama 2 jam ($p > 0.05$), hal ini dapat dikatakan bahwa pada lama waktu pajanan 2 jam

berpengaruh sama terhadap rerata konsentrasi spermatozoa baik pada dosis 2 W/kg maupun dosis 5.7 W/kg (Tabel 4). Penurunan konsentrasi spermatozoa pada pajanan selama 1 jam disebabkan oleh energi panas yang ditimbulkan dari radiasi gelombang elektromagnetik diserap spermatozoa (Tribuana, 2006). Peningkatan frekuensi menyebabkan peningkatan energi yang diserap oleh spermatozoa. Hal ini disebabkan suhu menjadi faktor merugikan yang bersifat reversibel terhadap produksi sperma (Jung & Schill, 2000), sehingga merupakan target penting terhadap efek termal pajanan radiasi ponsel (Dasdag *et al.*, 1999). Selain efek termal pajanan radiasi ponsel, radiasi ponsel juga memiliki emisi radiasi yang bersifat melingkar, hal ini menyebabkan pada saat pemberian intervensi pajanan radiasi, spermatozoa bergerak ke tepi petri dish sehingga pada saat penghitungan konsentrasi spermatozoa seolah-olah konsentrasinya berkurang. Hal ini ditunjukkan pada pajanan 2 jam konsentrasi spermatozoa sama baik pada dosis 2 W/kg maupun 5.7 W/kg.

Pada keadaan *in vivo*, proses spermatogenesis pada testis manusia membutuhkan suhu fisiologis 2° C lebih rendah dari suhu tubuh optimal, jarak testis dengan sumber radiasi, serta konduksi pada permukaan aliran darah. Bila testis berada pada suhu yang lebih tinggi (> 2⁰C) akan terjadi degenerasi tubulus dan spermatogenesis terhambat secara parsial atau total yang pada akhirnya terjadi infertilitas (Ganong, 2003). Testis merupakan organ superfisial sehingga menyerap lebih banyak energi daripada organ lainnya. Efek termal yang dipancarkan ponsel pada SAR <2 W/ kg tidak ada

pengaruhnya terhadap spermatozoa (Yan *et al.*, 2007; Anderson & Rowley, 2007), namun pada $SAR > 4 \text{ W/kg}$ bisa menghasilkan kenaikan suhu 1°C .

b. Pengaruh pajanan ponsel terhadap motilitas spermatozoa

Motilitas sperma mempunyai peranan penting dalam mencapai ovum wanita sehingga gangguan motilitas sperma sering menjadi salah satu penyebab infertilitas pria. Motilitas sperma ditentukan oleh persentase sperma yang bergerak aktif serta kemampuannya untuk bergerak di dalam rahim. Hasil penelitian menunjukkan terdapat korelasi negatif antara rerata persentase jumlah motilitas kriteria *slow progressive* (B) (Gambar 14) dengan peningkatan penggunaan ponsel. Sedangkan untuk motilitas kriteria *non-progressive* (C) (Gambar 15) dan *non-motile* (D) (Gambar 16) berkorelasi positif dengan peningkatan penggunaan ponsel. Hal ini sesuai dengan penelitian de Iuliis (2009) dan Eroglu *et al.* (2006) bahwa setelah terpajan radiasi ponsel terjadi penurunan motilitas *rapid progressive* (A) dan *slow progressive* (B) spermatozoa manusia dan peningkatan motilitas *non-progressive* (C) dan *non-motile* (D).

Kapasitasi spermatozoa yaitu kemampuan spermatozoa untuk menyimpan energi untuk bergerak. Proses kapasitasi melibatkan dua komponen yaitu meningkatkan kecepatan gerak spermatozoa dan mempermudah persiapan spermatozoa mengalami reaksi akrosom (Ganong, 2003). Selain itu mitokondria menjadi organel penting yang berhubungan dengan motilitas spermatozoa. Mitokondria adalah organel sel eukariot yang berfungsi sebagai organ respirasi pembangkit

energi dengan menghasilkan adenosin triphosphat (ATP). Jumlah mitokondria tiap sel tergantung jenis sel dan organisme. Mitokondria ditemukan dalam jumlah banyak pada sel yang memiliki aktivitas metabolisme tinggi yaitu sel-sel kontraktil seperti spermatozoa. Ekor sperma merupakan alat gerak yang membutuhkan energi tinggi dari mitokondria yang banyak didapatkan pada bagian leher (Ganong, 2003).

Motilitas sperma yang rendah, dapat menjadi penyebab keadaan infertilitas pria (Jensen *et al.*, 2011). Hal ini dapat dijelaskan bahwa pajanan radiasi ponsel menghasilkan arus listrik bermuatan negatif saat melewati membran sel, sedangkan tubuh berperan sebagai antena menyerap radiasi ponsel dan mengubahnya menjadi *alternating eddy currents*. Kation seperti Ca^{2+} dan Mg^{2+} mengikat secara alami dengan membran sel berisi protein fosfolipid bermuatan negatif, dan mengganggu stabilitas sel membran (Goldsworthy, 2007), mendorong ion kalsium (*Ca efflux*) dan merusakkan membran sel (Goldsworthy, 2007), sehingga Ca^{2+} habis digantikan oleh kalium yang membuat membran sel lemah dan bocor, karena kalium memiliki kemampuan terbatas untuk menstabilkan membran. Kerusakan pada membran plasma menyebabkan gangguan motilitas spermatozoa yang dapat dilihat dalam berbagai penelitian (Alavi & Cosson, 2006).

Dalam penelitian ini didapatkan data bahwa motilitas kriteria *non-progressive*(C) (Gambar 15) dan *non-motile* (D) (Gambar 16) berkorelasi positif dengan peningkatan intensitas penggunaan ponsel. Semakin besar intensitas pajanan radiasi ponsel, semakin banyak spermatozoa yang mengalami gangguan

motilitas berupa tidak bergerak progresif dan bahkan tidak bergerak sama sekali.

Hal ini dikarenakan bahwa pajanan radiasi ponsel mempengaruhi membran plasma di bagian leher sperma dimana terdapat banyak mitokondria yang berguna sebagai sumber energi untuk motilitas sperma. Apabila mitokondria mengalami kerusakan berarti motilitas spermatozoa juga terganggu (Ahmad & Baig,2011).

Pajanan radiasi ponsel menyebabkan terjadinya kenaikan ROS, yang merupakan salah satu bentuk radikal bebas yang memiliki reaktivitas sangat tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan sifatnya yang segera menarik atau menyerang elektron di sekitarnya yang dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya diambil. Target utama radikal bebas adalah protein, lipoprotein, unsur DNA termasuk karbohidrat dan terutama asam lemak tak jenuh atau *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA) yang merupakan komponen membran plasma pada spermatozoa yang mudah diserang oleh ROS. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang dapat berefek terhadap penurunan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa sehingga merupakan salah satu faktor risiko infertilitas pria (Hamada *et al.*, 2011).

Dalam penelitian ini didapatkan sel lain selain spermatozoa yaitu leukosit, hal ini mempengaruhi *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui mekanisme gangguan pada integritas mitokondrial (komponen utamanya phospholipid) berupa proses lipid peroksidasi yaitu jika asam lemak phospholipid dioksidasi oleh radikal bebas (*stress oksidatif*) menghasilkan radikal bebas dan peningkatan produksi ROS spermatozoa (Kesari *et al.*, 2011) oleh rangsangan NADH oksidase dan terjadi pengurangan produksi ATP, maka terjadi peningkatan konsentrasi

MDA dan potensial membran mitokondria akan mengalami gangguan yang berakibat terjadi kelainan pada motilitas spermatozoa berupa penurunan persentase *fast progressive* motilitas dan menaikkan persentase *non-motilespermatozoa* (Falzone *et al.*, 2010;Ahmad & Baig,2011;Agarwal *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2003). Peningkatan produksi ROS akan mengurangi aktivitasProtein Kinase C (PKC). PKC terlokalisir di segmen equatorial sperma dan di *principal piece* flagel sehingga berperan terhadap motilitas sperma (Rotem *et al.*, 1990). Sumber radikal bebas bertanggung jawab menghasilkan stres pada mitokondria yang menyebabkan terjadinya apoptosis melalui jalur nitrit (Koppers *et al.*, 2008). Kelebihan ROS terdeteksi dengan adanya leukosit (Falzone *et al.*, 2010).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama waktu pajanan (akut dan kronik) serta besarnya dosis berpengaruh terhadap rerata persentase motilitas kriteria *non-motile* (D) spermatozoa yaitu, semakin lama dan semakin besar intensitas radiasi ponsel, rerata persentase jumlah motilitas kriteria *non-motile* (D) spermatozoa semakin bertambah (Gambar 16). Hal ini dapat dijelaskan bahwa pada pajanan akut, radiasi ponsel menyebabkan peningkatan lipid peroksida pada membran sperma yang mengandung PUFA melalui peningkatan produksi ROS, sehingga merangsang aktivitas enzim oksidase membran NADH plasma, dan menurunkan produksi ATP, yang ditandai dengan peningkatan konsentrasi MDA (Ahmad & Baig, 2011; Friedman *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2009). Hal ini akan merusak biomolekul termasuk fragmentasi DNA, enzim, lipid, dan protein (De Iuliis *et al.*,2009) sehingga menyebabkan terjadinya penurunan

persentase motilitas kriteria *slow progressive* (C) dan peningkatan persentase motilitas kriteria *non-motile* (D). Sedangkan pada pajanan radiasi ponsel secara kronik, berkaitan dengan kelebihan ROS, menyebabkan aktivasi *heat shockprotein* (hsp) sebagai respon pelindung. Tugas hsp adalah bergabung dengan enzim penting, membentuk lapisan pelindung di sekitar enzim, untuk melindungi dari kerusakan, namun aktivasi hsp tidak dapat untuk melindungi dari semua stres, sehingga dapat mempengaruhi metabolisme sperma. *Heat shock protein* (hsp) menstabilkan endotel serat stres dan mengubah sekresi *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas *bloodbarier* testis dan penyebab infertilitas (Desai *et al.*, 2009).

Berdasarkan penelitian ini, dapat dikatakan bahwa peningkatan risiko stres oksidatif dalam spermatozoa karena radiasi elektromagnetik ponsel adalah nyata, namun beban risiko ini ditentukan oleh durasi penggunaan ponsel, frekuensi radiasi ponsel, SAR dan jarak dengan organ reproduksi pria.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ada penurunan persentase jumlah motilitas kriteria *slow progressive* (B) (Gambar 14) dengan peningkatan penggunaan ponsel. Sedangkan untuk motilitas kriteria *non-progressive*(C) (Gambar 15) dan *non-motile* (D) (Gambar 16) berkorelasi positif dengan peningkatan penggunaan ponsel akibat pajanan radiasi elektromagnetik ponsel seiring dengan peningkatan lama dan intensitas pajanan radiasi ponsel. Ini sesuai dengan hipotesis peneliti yaitu semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*, dalam hal ini terhadap persentase jumlah

motilitas kriteria spermatozoa *slow progressive* (B), *non-progressive* (C) dan *non-motile* (D).

c. Pengaruh pajanan ponsel terhadap morfologi spermatozoa

Lama waktu pajanan (akut dan kronik) dan besarnya dosis (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg) berpengaruh terhadap rerata persentase morfologi normal spermatozoa yaitu semakin lama dan semakin besar intensitas radiasi ponsel, rerata persentase morfologi normal spermatozoa (Gambar 18) semakin berkurang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wdowiak *et al.*, (2007) yang mencatat terjadi peningkatan signifikan persentase sel sperma abnormal morfologi yang berhubungan dengan durasi pajanan radiasi ponsel. Dalam penelitian ini abnormalitas spermatozoa terjadi akibat radikal bebas pada pajanan radiasi ponsel. Hal ini dapat dilihat antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, dimana terjadi penurunan jumlah morfologi spermatozoa normal pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel. Sesuai dengan pendapat Hamada *et al.* (2011), bahwa meningkatnya abnormalitas morfologi dapat disebabkan adanya radikal bebas yang berasal dari radiasi ponsel.

Dalam penelitian ini, lama waktu pajanan (akut dan kronik) serta besarnya dosis (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg) tidak berpengaruh terhadap rerata persentase kelainan morfologi kepala. Dalam penelitian ini, rerata persentase kelainan morfologi kepala sama pada kelompok kontrol dan pajanan radiasi ponsel sehingga terjadinya kelainan morfologi kepala kemungkinan dikarenakan efek termal dari radiasi yang menyebabkan stres fisik spermatozoa sehingga

mempengaruhi membrane plasma spermatozoa dengan akibat terjadi kelainan morfologi kepala berupa kepala kecil dan pyriform.

Semakin lama dan semakin besar intensitas radiasi ponsel, rerata persentase kelainan morfologi kelainan leher spermatozoa (Gambar 20), rerata persentase morfologi kelainan ekor spermatozoa (Gambar 22) dan rerata persentase morfologi kelainan sitoplasma spermatozoa (Tabel 12) semakin bertambah.

Pajanan radiasi ponsel menyebabkan produksi radikal bebas meningkat pada kondisi *in vitro*. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sifatnya tidak stabil sehingga untuk memperoleh pasangan elektron, molekul ini cenderung bersifat sangat reaktif dan korosif bagi sel sehat. Jumlah radikal bebas yang berlebihan menyebabkan kerusakan membran spermatozoa akibat terbentuknya lipid peroksida pada membran plasma (Hamada *et al.*, 2011). Membran plasma spermatozoa mengandung fosfolipid dan asam lemak tak jenuh dalam jumlah besar, dimana asam lemak tak jenuh ini sangat rentan terhadap serangan radikal bebas, terutama radikal hidroksil, sehingga ROS dapat dengan mudah menembus masuk membran plasma. Radikal hidroksil itu akan menimbulkan reaksi rantai yang disebut peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik terhadap spermatozoa (Gye & Park, 2012). Hal ini akan menghasilkan morfologi spermatozoa yang abnormal.

Sedangkan secara *in vivo*, hal ini terjadi karena pengaruh pajanan radiasi ponsel dapat mempengaruhi sintesis hormon testoteron melalui dua mekanisme.

Mekanisme pertama mengganggu aktivitas enzim adenil siklase pada membran sel Leydig (secara intra testikuler) sehingga mengakibatkan terhambatnya sintesis hormon testosteron. Mekanisme kedua menstimulasi medula adrenal (secara ekstra testikuler) untuk melepaskan katekolamin. Katekolamin dapat mempengaruhi sistem saraf pusat sehingga dapat mengganggu proses spermatogenesis dan sintesis hormon testosteron melalui mekanisme umpan balik antara hipotalamus-hipofisis anterior-testis. Hormon testosteron berperan dalam maturasi spermatozoa di epididimis (Amarudin, 2012). Penurunan kadar testosteron menyebabkan proses spermiogenesis tidak berjalan optimum sehingga menurunkan kualitas termasuk morfologi spermatozoa. Oleh karena itu abnormalitas morfologi terjadi pada proses spermatogenesis yaitu pada tahap spermiogenesis yang mengakibatkan terganggunya fungsi enzim dan mekanisme kerja hormon dalam pembentukan spermatozoa (Hamada *et al.*, 2011; (Otitoloju *et al.*, 2010).

Hasil pengamatan mikroskopis spermatozoa yang mendapat pajanan radiasi ponsel terlihat adanya sel spermatozoa yang tidak normal yaitu tidak adanya ekor atau kepala, kepala kecil, ekor melipat, ekor putus dibagian tengah (Gambar 20) yang menunjukkan sel-sel tersebut mengalami degenerasi. Abnormalitas pada morfologi spermatozoa ini terdiri dari abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer dapat terjadi karena kelainan pada saat proses spermatogenesis yang terjadi di tubuli seminiferi, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi kerusakan spermatozoa selama perjalanan melalui

epididimis, selama fase ejakulasi atau setelah ejakulasi terjadi atau kesalahan dalam preparasi prepat(Amarudin, 2012).

Kelainan abnormal kepala spermatozoa terjadi pada saat spermatogenesis (*in vivo*). Spermatogenesis dapat terjadi melalui beberapa tahap pembelahan. Tahap awal, spermatogonia mengalami perubahan menjadi spermatosit primer, kemudian menjadi spermatosit sekunder dan menjadi spermatid. Sebelum spermatid menjadi spermatozoa ada fase yang dilewati spermatid yang disebut fase spermiogenesis. Fase ini terdiri dari fase golgi, tutup, akrosom dan pematangan bertujuan untuk membentuk morfologi normal spermatozoa yang terdiri dari kepala, leher dan ekor. Gangguan kelainan ini bisa disebabkan oleh akibat hormonal, radikal bebas dan bahan suplemen makanan (Gye & Park, 2012).Radikal bebas menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Membran sel ini sangat penting bagi fungsi reseptor dan fungsi enzim, sehingga terjadinya peroksidasi lipid mengakibatkan hilangnya fungsi seluler secara total (Amarudin, 2012). Gangguan pada saat spermatogenesis ini terjadi akibat kekurangan energi, hal ini karena pajanan radiasi ponsel dapat mengubah mekanisme kerja hormon dan enzim yang mengatur motilitas dan morfologi sperma.

Pada kepala dan ekor spermatozoa dihubungkan oleh membran sel sehingga memungkinkan terjadinya pemisahan selama pergerakan sel dan perpindahan sitoplasma. Pada spermatozoa yang mengalami abnormalitas pada bagian posterior kepala, kadang tidak terbentuk membran yang sempurna sehingga kontak dengan basal ekor kurang kuat, hal ini karena kerusakan

membran spermatozoa oleh ROS dan peroksidasi lipid asam lemak tak jenuh pada kepala dan leher spermatozoa menyebabkan perubahan morfologi spermatozoa(Gye & Park, 2012).

Kelainan morfologi ekor spermatozoa berupa ekor yang tergulung atau lepas terjadi apabila radikal bebas yang terbentuk bertemu dengan asam lemak tak jenuh dalam membran sel, sehingga terjadi reaksi peroksidasi lipid membran sel yang mengakibatkan peningkatan fluiditas membran, gangguan integritas membran dan inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Hal ini akan menyebabkan peningkatan kerusakan sel spermatozoa(Amarudin, 2012). Apabila produksi ATP mitokondria rendah dan ATP intraseluler berkurang dengan cepat berakibat pada kerusakan aksonema, penurunan viabilitas spermatozoa, meningkatnya kerusakan morfologi midpiece,kehilangan kemampuan kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa serta adanya hambatan pergerakan spermatozoa. Hal ini akan meningkatkan kelainan ekor spermatozoa akibat rendahnya ATP mitokondria oleh radikal bebas dari pajanan radiasi ponsel(Ahmad & Baig,2011; Hamada *et al.*, 2011).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ada penurunan rerata persentase spermatozoa yang mempunyai morfologi normal (Gambar 18) dengan peningkatan penggunaan ponsel. Sedangkan untuk spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher, ekor dan sitoplasma berkorelasi positif dengan peningkatan penggunaan ponsel akibat pajanan radiasi elektromagnetik ponsel seiring dengan peningkatan lama dan intensitas pajanan radiasi ponsel. Ini sesuai dengan hipotesis peneliti yaitu semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi

gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*, dalam hal ini terhadap rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher, ekor dan sitoplasma.

Penggunaan ponsel mempengaruhi kualitas spermatozoa dengan menurunkan konsentrasi spermatozoa, meningkatkan immotilitas dan meningkatkan kelainan morfologi spermatozoa, yang berhubungan dengan infertilitas pria. Hal ini sesuai dengan hipotesis peneliti bahwa semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia.

2.Pengaruh Pajanan Ponsel terhadap Fungsionalitas Spermatozoa

Radiasi ponsel menyebabkan perubahan pada ROS, dan aktivitas enzim antioksidan (Kesari *et al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2010).Moustafa *et al.* (2001) menunjukkan bahwa terdapat penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti *superoksida dismutase* dan *glutation peroksidase* eritrosit manusia yang terpajan radiasi ponsel. Pajanan jangka panjang radiasi ponsel menurunkan aktivitas *catalase*, *superoksida dismutase* (SOD) dan *glutathione peroksidase* (GSH-Px), dan dengan demikian mengurangi total kapasitas antioksidan dalam organ tubuh yang berbeda-beda (Oral *et al.*, 2006; Balci *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

Penurunan aktivitas SOD menunjukkan peningkatan generasi ion superoksida reaktif. Induksi pajanan radiasi ponsel menyebabkan *stress oksidatif* yang bermanifestasi terjadinya perubahan kompleks enzim PKC pada tubulus seminiferus dan sel Leydig. Antioksidan seperti melatonin, asam caffeic, fenil

ester, vitamin C, dan vitamin E mencegah *stress oksidatif* atau apoptosis yang disebabkan oleh radiasi ponsel di berbagai jaringan hewan (Oktem *et al.*, 2006; Ozguner *et al.*, 2006; Oral *et al.*, 2006).

a. Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah sel spermatozoa yang mengalami apoptosis

Pada pemeriksaan apoptosis dengan *flowcytometry*, peneliti tidak melakukan sentrifugasi (pemusingan) dengan alasan bahwa sentrifugasi menyebabkan rendahnya hasil motilitas disebabkan kerusakan integritas membran. Susilawati (2011), menyebutkan bahwa sexing dengan cara sentrifugasi mengakibatkan kerusakan membran secara struktural. Fungsi membran adalah sebagai pelindung sel, apabila membran sel rusak berakibat rusaknya organel-organel yang terdapat di dalam sel seperti mitokondria dan lisosom. Mitokondria merupakan tempat terjadinya respirasi sel menghasilkan energi, sehingga rusaknya mitokondria mengganggu proses metabolisme yang secara langsung mempengaruhi pergerakan spermatozoa, dan kerusakan lisosom mengakibatkan lisisnya enzim yang ada dalam spermatozoa.

Sentrifugasi mempengaruhi integritas membran spermatozoa, integritas membran adalah keutuhan membran spermatozoa atau suatu keadaan yang menunjukkan mekanisme fungsi fisiologis membran tetap terjaga sebagai kontrol terhadap sistem transport. Integritas membran spermatozoa sangat erat kaitannya dengan kondisi fisiologis spermatozoa yaitu spermatozoa dalam keadaan utuh, kapasitas dan reaksi akrosom. Sentrifugasi juga mempengaruhi proses fisiologis

spermatozoa yang dipisahkan karena mengakibatkan gesekan mekanis antara spermatozoa dengan medium, hal ini akan memacu proses kapabilitas yang berlanjut dengan adanya fusi antara membran luar akrosom dan ditandai dengan peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} di daerah equator membran kepala spermatozoa disebut reaksi akrosom sehingga spermatozoa menjadi labil dengan terlepasnya enzim-enzim yang ada di akrosom (Susilawati, 2011).

Hasil penelitian didapatkan bahwa rerata persentase spermatozoa yang mengalami apoptosis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dimana rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol (Tabel 13). Hal ini dikarenakan pajanan radiasi ponsel menyebabkan perubahan homeostasis kalsium dengan konsekuensi mempengaruhi pada jalur metabolisme makromolekul seluler. Pajanan radiasi ponsel menginduksi perubahan membran plasma potensial dan kalsium efflux dengan akibat terjadi pengurangan kalsium yang dihasilkan (sesuai Gambar 30) sehingga menyebabkan penurunan aktivitas protein kinase C (PKC). Penurunan ini menyebabkan perubahan pada enzim, pompa ion, saluran dan protein serta mendorong terjadinya apoptosis (Gambar 26) serta perubahan serum testosteron, ekspresi mRNA untuk enzim pertama dalam steroidogenesis di sel Leydig (Zhou *et al.*, 2005).

Hasil penelitian Kesari *et al.* (2010) dan Kesari *et al.* (2011) menunjukkan bahwa apoptosis meningkat pada sel Leydig testis akibat pajanan radiasi ponsel. Apoptosis secara seluler merupakan proses normal yang terjadi selama

perkembangan embrional. Apoptosis memiliki peran dalam proses fisiologis autodestruksi seluler yang penting bagi perkembangan, kelangsungan spermatogenesis secara normal, pemeliharaan homeostasis, keseimbangan antara sel germinal dengan sel Sertoli dan pertahanan hospes organisme multiseluler (Kramer,2000; Reed, 2000).

Rerata persentase jumlahspermatozoa yang mengalami apoptosis kelompok yang terpajan radiasi 2 W/kg selama 1 jam dan 2 jam tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$), juga untuk kelompok yang terpajan radiasi 5.7 W/kg selama 1 jam dan 2 jam juga tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa durasi waktu 1 jam pajanan radiasi ponsel berpengaruh terhadap jumlah sel spermatozoa yang mengalami apoptosis baik pada kelompok pajanan 2 W/kg dan 5.7 W/kg.

Apoptosis memiliki hubungan signifikan dengan infertilitas pria (Colin *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2012). Pada testis immature, apoptosis sering terjadi sehingga apoptosis pada spermatozoa merupakan indeks yang kuat dan dipakai sebagai petanda adanya gangguan kesuburan pria (El-Melegy & Ali, 2011; Sharoareet *et al.*, 2011). Apoptosis dan kerusakan DNA dapat mencegah proses pemasakan sperma, akibatnya menjadi azoospermia sebagai akibat dari ketidakseimbangan dalam jalur apoptosis (Agarwal & Said, 2005). Analisis pada tingkat molekuler ini diperlukan pada kasus infertilitas idiopatik/ yang penyebabnya belum diketahui (Hadi, 2011).

Hasil penelitian peneliti menunjukkan bahwa ada korelasi positif antara apoptosis dengan motilitas kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa ($p = 0.046$; $r =$

0.348) dimana semakin banyak spermatozoa yang mengalami apoptosis, maka semakin meningkat juga jumlah spermatozoa yang memiliki motilitas kriteria *non-progressive* (C). Hal ini sesuai dengan penelitian Paasch *et al.* (2004) dan Marchetti *et al.* (2004a) bahwa komponen sinyal *cascade* apoptosis berkorelasi kuat dengan motilitas sperma dan morfologi spermatozoa (Aziz *et al.*, 2007) serta kemampuan fertilisasi spermatozoa manusia (Said *et al.*, 2006; Grunewald *et al.*, 2007). Penelitian Aziz *et al.* (2007) menunjukkan bahwa selama apoptosis, kelainan pada ekor spermatozoa terjadi dikarenakan *positive annex* yang membuat gerakan ekor menjadi sulit. Hasil penelitian Sakkas *et al.* (1999) juga menunjukkan bahwa individu dengan tingkat apoptosis tinggi memiliki persentase peningkatan sperma dengan kerusakan genetik dan jumlah sperma immotil yang lebih tinggi pula.

Hasil penelitian Aziz *et al.* (2007) dan Siddighi *et al.* (2004) menunjukkan ada hubungan terbalik antara persentase apoptosis pada ejakulasi sperma manusia dengan motilitas *fast progressive* spermatozoa. Hasil penelitian Chen *et al.* (2006) dilaporkan bahwa pada pria infertil, kualitas sperma lebih buruk dengan adanya peningkatan kerusakan DNA lebih tinggi dibandingkan pada pria fertile dimana peningkatan apoptosis memiliki hubungan dengan penurunan kualitas sperma. Pada penelitian meta-analisis tentang konsentrasi sperma dan hubungannya dengan apoptosis menunjukkan bahwa apoptosis mempengaruhi konsentrasi sperma dan mempengaruhi kesuburan ($p=0,001$). Hubungan ini mirip dengan penelitian Said *et al* (2010); Zorn *et al.* (2010); dan Stiblar (2009).

Penggunaan ponsel mempengaruhi fungsionalitas spermatozoa dengan meningkatnya jumlah sel spermatozoa yang mengalami apoptosis berhubungan dengan infertilitas pria. Hal ini sesuai dengan hipotesis peneliti bahwa semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro* yang ditandai dengan peningkatan jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis.

b. Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah Ca intraseluler spermatozoa

Hasil penelitian didapatkan perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol dengan pajanan 2 W/kg selama 1 jam ($p < 0.05$), sedangkan pada pajanan 2 jam tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$), juga terjadi pada kelompok pajanan 5.7 W/kg. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pajanan selama 1 jam dapat mempengaruhi rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa baik pada dosis 2 W/kg maupun dosis 5.7 W/kg (Tabel 14). Sedangkan kelompok kontrol yang diberi verapamil, thapsigargin, dan progesterone mempengaruhi rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa setelah terpajan selama 2 jam.

Dilihat dari rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa pada kondisi *in vitro* terjadi kecenderungan penurunan jumlah kalsium mendekati rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok kontrol pada kelompok yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg, kelompok verapamil dan thapsigargin, kecuali kelompok progesterone yang terjadi kenaikan rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa dibanding kelompok kontrol (Gambar 30). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penutupan

kanal kalsium pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel, kelompok thapsigargin dan kelompok verapamil sehingga jumlah kalsium intraseluler spermatozoa pada kelompok tersebut berkurang.

Pada kelompok progesterone terjadi peningkatan jumlah kalsium intraseluler karena sifat progesterone yang membuka kanal kalsium sehingga kalsium dari luar sel akan masuk ke dalam sel. Ion kalsium sebagai *messenger* intraseluler terpenting dalam mengatur motilitas sperma yang dimediasi oleh kanal Ca^{2+} , dapat menurunkan aktivitas sperma. Dalam kondisi fisiologis, Ca^{2+} adalah ion terpenting dalam regulasi motilitas sperma manusia. Hal ini tampak bahwa pada membran plasma dengan pinggir yang halus (flagella) yang pada permukaannya terdapat *voltage-gated.transient receptor potensial calcium channel* pada bagian ekor sperma dan berfungsi merangsang motilitas sperma melalui masuknya Ca^{2+} (Castellano *et al.*, 2003). Kanal Ca^{2+} (CatSper) spesifik terdapat pada ekor sperma berhubungan dengan kehilangan motilitas secara progresif yang menyebabkan infertilitas.

Penggunaan ponsel mempengaruhi fungsionalitas spermatozoa dengan menurunnya jumlah kalsium intraseluler spermatozoa pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel, kelompok verapamil dan thapsigargin, sedangkan pada kelompok progesterone terjadi sebaliknya. Hal ini sesuai dengan hipotesis peneliti bahwa semakin menurun jumlah kalsium intraseluler spermatozoa maka semakin rendah fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro* yang ditandai dengan penurunan jumlah kalsium intraseluler spermatozoa.

3. Pengaruh pajanan radiasi ponsel terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa

Calcium adalah salah satu molekul *secondary messenger*. Protein kinase C (PKC) adalah salah satu jalur yang berhubungan dengan *secondary messenger* dan merupakan keluarga enzim yang terlibat dalam mengendalikan fungsi pompa protein lainnya dan kanal melalui fosforilasi gugus hidroksil serin dan residu asam amino treonin protein (Larsson, 2008). Enzim PKC diaktifkan oleh sinyal seperti peningkatan konsentrasi diasilgliserol atau Ca^{2+} . Oleh karena itu enzim PKC memainkan peran penting di beberapa kaskade transduksi sinyal seperti mediasi respon seluler terhadap rangsangan ekstraseluler dalam proliferasi, diferensiasi, apoptosis, dan pengeluaran exocytotic di sejumlah sel non saraf dan sel sperma (Naor & Breitbart, 1997). Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel diduga mempunyai pengaruh terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa, sehingga untuk mengetahui pengaruh tersebut dilakukan pemeriksaan secara *Immunocytochemistry* (ICC).

Kanal kalsium memainkan peran penting dalam pengaturan fungsi sel spermatozoa. Di dalam spermatozoa terdapat beberapa kanal kalsium antara lain : *voltage-sensitive* Ca^{2+} selective channels, *cyclic nucleotide-gated channels* dan *transient receptor potensial channels*. CatSper mempunyai peran yang esensial dalam motilitas, hiperaktivitas sperma dan fertilitas pria (Mohammadi *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini, penilaian ekspresi VGCC berdasarkan hasil pemeriksaan imunositokimia ada 2 kategori, yaitu ekspresi VGCC (+) artinya VGCC terbuka (fase aktif), sehingga pada saat dilakukan penetesan

antibodiprimer CatSper, antibodi tersebut dapat masuk ke dalam intra sel dan berikatan dengan epitop yang terletak pada loop intra sel antara homolog domain III dengan homolog domain IV. Pada saat dilakukan penetesan DAB (pewarna) maka zat tersebut akan melekat pada ikatan antigen dan antibodi tersebut, sehingga cairan intra sel (sitoplasma) akan berwarna coklat seperti yang terlihat pada Gambar 32 dan 33.

Ekspresi VGCC (-) artinya VGCC inaktif (*closed*), sehingga pada saat dilakukan penetesan antibodiprimer CatSper, antibodi tersebut tidak dapat masuk ke dalam intra sel dan tidak dapat berikatan dengan epitop yang terletak pada loop intra sel antara homolog domain III dengan homolog domain IV. Pada saat dilakukan penetesan DAB (pewarna) maka zat tersebut tidak akan melekat oleh karena tidak ada ikatan antigen dan antibodi tersebut, sehingga cairan intra sel (sitoplasma) tidak berwarna coklat (Gambar 34).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel, dan kelompok verapamil mempunyai ekspresi VGCC jumlahnya sedikit (Tabel 15) maka hal ini menunjukkan bahwa pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dapat menurunkan ekspresi VGCC sehingga dapat dikatakan bahwa pajanan radiasi ponsel menyebabkan ekspresi VGCC /kanal kalsium menutup sesuai hasil penelitian pada kelompok yang mendapat intervensi verapamil dimana verapamil berfungsi sebagai *blocker* kanal kalsium.

Ada perbedaan intensitas warna diantara kelompok spermatozoa pada pemeriksaan dengan *Immunocytochemistry* (ICC). Intensitas warna terkuat

terdapat pada kelompok yang mendapat intervensi progesteron, dibanding kelompok kontrol. Intensitas warna kanal *CatSper* lebih rendah pada kelompok yang mendapat verapamil dibanding kelompok kontrol. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa pemberian progesteron pada spermatozoa manusia dapat menyebabkan peningkatan kualitas sperma dan ada hubungan positif antara pemberian progesteron dengan peningkatan parameter sperma serta terdapat hubungan negatif antara pemberian verapamil dengan kualitas parameter spermatozoa.

Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis bahwa pemberian progesteron secara signifikan meningkatkan kualitas parameter sperma sebaik ekspresi gen *CatSper*, sehingga ada perbedaan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa yang mendapat intervensi pajanan radiasi ponsel, verapamil, thapsigargin, dan progesterone, dimana pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menurunkan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa manusia. Pada penelitian Mohammadi *et al.* (2013) menunjukkan bahwa protein *CatSper* ditemukan pada *middle piece* dan bagian acrosom sperma. Protein *CatSper* juga terdapat pada *principal piece* pada flagella sperma. Hal ini menunjukkan bahwa peran penting *CatSper* pada fertilitas pria manusia (Hong-Gang *et al.*, 2006).

Intensitas pewarnaan protein *CatSper* sangat kuat pada sperma manusia yang diberi progesterone, dan berlokasi di *middle piece* flagella. Mekanisme molekular menunjukkan bahwa dengan mengatur kalsium intraseluler dan pH memainkan peran kunci dalam proses fertilisasi (Hong-Gang *et al.*, 2006). Untuk

penelitian lebih lanjut dititikberatkan pada mekanisme regulasi fisiologi fertilitas pria.

Ada hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa dengan kualitas spermatozoa (konsentrasi sel $p=0.003$; $r=0.361$; motilitas B $p=0.000$; $r=0.664$; motilitas D $p=0.000$, $r=-0.660$; morfologi normal $p=0.000$; $r=0.634$; morfologi kelainan ekor $p=0.008$, $r=-0.324$) dan fungsionalitas spermatozoa (apoptosis $p=0.039$; $r=0.257$) setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel. Artinya semakin banyak ekspresi VGCC di dapat berarti semakin banyak kanal kalsium yang bersifat terbuka, sehingga semakin baik kualitas (konsentrasi, morfologi, motilitas) dan fungsionalitas (apoptosis, Ca intraseluler) spermatozoanya. Hal ini karena ekspresi VGCC (*CatSper*) adalah kanal ion kalsium pertama yang berhubungan dengan motilitas dan hiperaktivasi. Kekurangan *CatSper* seperti pada saat pemberian verapamil dan akibat pajanan radiasi ponsel bersifat menutup kanal kalsium menyebabkan terjadinya infertil sebagai hasil dari gangguan pada motilitas sperma dan ketidakmampuan untuk membuahi pada oocyt yang utuh (Hong-Gang *et al.*, 2006). Mekanisme yang mendasari hasil penelitian ini adalah adanya aktivasi reseptor (misalnya, reseptor ZP di kepala sperma) sebagai *messenger* yang akhirnya menyebabkan aktivasi kanal *CatSper* di bagian ekor sehingga kanal akan terbuka. Ion Ca^{2+} memasuki ekor sperma melalui aktivitas *CatSper* tidak hanya secara lokal pada protein motor untuk mempengaruhi motilitas sperma tetapi juga secara global menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler di *midpiece* sperma dan kepala. Ada kanal Ca^{2+} -permeable untuk

CatSper-independen, dapat meningkatkan $[Ca^{2+}]$ intraseluler yang penting untuk reaksi akrosom (Ren& Xia, 2010).

Penggunaan ponsel mempengaruhi ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa dengan menurunnya jumlah ekspresi VGCC spermatozoa pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel, kelompok verapamil dan thapsigargin, sedangkan pada kelompok progesterone terjadi sebaliknya. Hal ini sesuai dengan hipotesis peneliti bahwa ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa menghambat kualitas spermatozoa setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel secara *in vitro*.

Berdasarkan pembahasan di atas, dapatlah disimpulkan bahwa pajanan radiasi ponsel dapat mempengaruhi tubuh manusia melalui beberapa mekanisme yaitu pertama melalui sistem saraf pusat (*hypothalamus*) pada kondisi *in vivo* dan kedua langsung mengenai organ testis pada kondisi *in vitro*. Pada mekanisme pertama, pajanan radiasi ponsel mempengaruhi *hypothalamus* sehingga pengeluaran GnRH terganggu, hal ini tentunya juga akan mengganggu pituitari anterior sehingga terjadi penurunan FSH yang mempengaruhi sel Sertoli berakibat terjadi gangguan pada spermatogenesis berupa perubahan konsentrasi sperma, morfologi sperma, apoptosis dan perubahan DNA yang berakibat terjadinya infertilitas. Selain penurunan FSH, terjadi juga peningkatan LH yang mempengaruhi sel Leydig berakibat terjadinya penurunan hormon testosterone yang berakibat terjadi perubahan fungsi jaringan berupa perubahan seks, sintesis protein di otot rangka dan pertumbuhan tulang masa remaja terganggu dan

menghambat organ reproduksi asesori dan karakteristik seks sekunder yang menyebabkan terjadinya infertilitas juga.

Mekanisme kedua, pajanan radiasi langsung mengenai organ testis, dengan target sasaran pada membrane plasma mitokondria dimana terdapat kanal kalsium yang terkena pajanan radiasi ponsel mengalami penutupan kanal dan terjadi mobilisasi kalsium intraseluler berakibat terjadinya reaksi dari formasi radikal bebas menyebabkan terjadinya overproduksi ROS sehingga terjadi ketidakseimbangan antioksidan dan defisiensi energi serta terjadi peningkatan fosforilasi yang berakibat menurunnya enzim *histone kinase*, *protein kinase C* dan *creatine kinase*, hsp-27, serta penurunan diameter tubulus seminiferus. Hal ini tentunya akan menyebabkan peningkatan apoptosis dan penurunan konsentrasi sperma dan peningkatan immotilitas spermatozoa dan berakibat terjadinya infertilitas.

Mekanisme molekular menunjukkan pajanan radiasi ponsel menyebabkan penutupan kanal ion kalsium (VGCC), dan berhubungan dengan motilitas spermatozoa, sehingga dengan mengatur kalsium intraseluler dan pH berperan penting dalam proses fertilisasi.

Untuk penelitian dengan pajanan radiasi ponsel secara *in vitro* artinya uji eksperimen dengan menggunakan biakan di dalam cawan petri, berarti yang diteliti di luar yang hidup tetapi kondisi lingkungan dibuat seperti keadaan sesungguhnya. Misalnya meneliti pengaruh pajanan ponsel terhadap spermatozoa (hanya pada satu organ saja), kultur jaringan/sel. Keuntungannya tidak ada interaksi dengan organ lain, sensitivitas meningkat, kondisi kontrol lebih baik, experimental dapat lebih fleksibel karena dilakukan di luar tubuh organism,

interpretasinya jelas, kapasitas sampel besar, substanti yang diperlukan untuk penelitian jumlahnya sedikit. Prosedur *invitro* mengacu pada prosedur yang dilakukan dalam lingkungan yang terkendali di luar organisme hidup, tidak dalam hidup organisme, tetapi dalam lingkungan terkontrol, misalnya di dalam tabung reaksi atau cawan petri. Banyak percobaan biologi seluler dilakukan di luar organisme atau sel karena kondisi pengujian mungkin tidak sesuai dengan kondisi di dalam organisme, ini dapat mengakibatkan hasil yang tidak sesuai dengan situasi yang muncul dalam organisme hidup. Jenis penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan pengaruh dari variabel eksperimental pada bagian pokok suatu organisme. Hal ini cenderung untuk memfokuskan pada organ, jaringan, sel, komponen sel, protein, dan/atau biomolekuler. Namun, kondisi yang terkendali dalam sistem *in vitro* berbeda secara signifikan dengan *in vivo*, oleh karena itu, dalam studi *in vitro* biasanya diikuti oleh studi *in vivo*.

Sedangkan bila secara *in vivo* artinya uji eksperimen dengan menggunakan keseluruhan organisme hidup, berarti yang diteliti di dalam tubuh yang hidup, langsung ke organismenya. Misalnya meneliti pengaruh radiasi ponsel secara sistemik, sehingga ada interaksi dengan organ lain, sulit mengontrol kondisi lingkungan, interpretasi kurang jelas karena adanya banyak bias, dan substanti yang digunakan untuk penelitian jumlahnya banyak. *In vivo* adalah eksperimen dengan menggunakan keseluruhan organisme hidup. Pengujian dengan hewan coba ataupun uji klinis merupakan salah satu bentuk penelitian *in vivo*. Pengujian *in vivo* lebih sering dilakukan karena lebih cocok untuk mengamati efek keseluruhan percobaan pada subjek hidup. Dalam biologi molekuler, *in vivo*

sering merujuk pada eksperimen yang dilakukan dalam sel hidup terisolasi, bukan pada keseluruhan organisme, misalnya, berasal dari sel-sel kultur biopsi.

C. Keterbatasan Penelitian

1. Validitas eksternal ditentukan oleh jumlah populasi (untuk menentukan homogenitas) dan randomisasi. Validitas eksternal pada penelitian ini kurang memenuhi syarat karena pada penelitian ini menggunakan spermatozoa yang hanya berasal dari satu orang meskipun sudah melalui tahapan skrening dengan melibatkan 15 orang untuk mendapatkan seorang donor yang sesuai kriteria WHO (1999).
2. Penghitungan konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa serta menghitung jumlah sel apoptosis dan Ca intraseluler serta ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) dilakukan pada saat sebelum pajanan diberikan (0 jam), satu (1) jam sebagai pajanan akut dan pada dua (2) jam sebagai pajanan kronik radiasi ponsel. Pada saat sebelum pajanan diberikan (0 jam), nilai rerata parameter tiga kelompok (kelompok kontrol, kelompok yang mendapat pajanan 2 W/kg dan kelompok yang mendapat pajanan 5.7 W/kg) sebaiknya dihitung pada semua kelompok tetapi pada penelitian ini hanya dihitung satu kelompok sebagai perwakilan dengan penghitungan dilakukan oleh 3 observer dan hasilnya dirata-rata sehingga hasil yang didapat relatif sama serta dengan mempertimbangkan keterbatasan waktu karena untuk mempersiapkan perlakuan intervensi berikutnya.

3. Subyektivitas dalam menilai/memeriksa parameter kualitas spermatozoa sangat tinggi, hal ini juga diakui oleh WHO pada pemeriksaan secara konvensional, meskipun peneliti sudah menggunakan 3 observer dalam menghitung konsentrasi, motilitas dan morfologi spermatozoa.

D.Upaya preventif dan promotif terhadap pajanan radiasi elektromagnetik ponsel

Penggunaan telepon seluleryangsemakin canggih digunakan, juga meningkatkan risiko adanya radiasi elektromagnetik. Oleh karena itu, perlu upaya untuk mencegah peningkatan dampak radiasi ponsel.

Pembentukan ROS adalah proses fisiologi tubuh, namun apabila terjadi peningkatan yang berlebihan maka akan dapat berpengaruh negatif terhadap tubuh. Untuk menetralsir kadar ROS, tubuh membutuhkan asupan antioksidan. Antioksidan pada semen dapat mengendalikan kadar ROS, sehingga kadar ROS tidak akan meningkat lebih dari fungsi normalnya. Hal ini tentunya dapat melindungi sperma dari kerusakan akibat *stress oksidatif* (Agarwal & Said, 2005). Selain itu antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menetralkan dan melawan bahan toksik (radikal bebas), serta menghambat terjadinya oksidasi sel sehingga kerusakan sel dapat dikurangi.

Peroksidasi lipid membran plasma spermatozoa menyebabkan spermatozoa kehilangan motilitas, viabilitas, dan mengalami kerusakan morfologi (Gye & Park, 2012). Tingginya kadar ROS tersebut perlu dihambat dengan antioksidan agar tidak terjadi stres oksidatif. Antioksidan adalah senyawa yang

dapat mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, karena antioksidan bersifat sebagai pemberi elektron atau reduktan. Untuk itu, dengan mengkonsumsi antioksidan yang cukup diharapkan dapat menurunkan kadar ROS dalam tubuh sehingga kerusakan sel dapat dicegah (Gye & Park, 2012)

Antioksidan dapat berupa antioksidan endogen, yaitu antioksidan yang diproduksi di dalam tubuh seperti glutathion peroksidase, superoksida dismutase, dan katalase yang merupakan jenis antioksidan alami enzimatis. Selain antioksidan endogen, terdapat juga antioksidan eksogen yang membantu kerja antioksidan endogen. Antioksidan eksogen dapat berasal dari makanan, seperti vitamin E(tokoferol), vitamin C, beta-karoten, zinc, selenium, sayuran dan buah-buahan yang mengandung antioksidan. Ketersediaan antioksidan dalam tubuh harus dipertahankan dan ditingkatkan untuk menangkal serangan radikal bebas. Serangan radikal bebas pada membran plasma spermatozoa akan menimbulkan reaksi rantai peroksidasi lipid, yang pada akhirnya menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa toksik terhadap spermatozoa. Peroksidasi lipid pada kepala dan ekor dapat menyebabkan perubahan morfologi spermatozoa (Agarwal & Said, 2005). Perubahan morfologi tersebut dapat dicegah dengan adanya vitamin E. Sedangkan pemberian 1,25(OH) D atau vitamin D dapat meningkatkan kadar kalsium intrasel, motilitas sperma, dan menginduksi reaksi akrosom pada spermatozoa matang (Ahmad & Baig, 2011). Selain itu lipid peroksidasi yang terjadi dapat dihambat dengan pemberian sinvastatin (Nordøy *et al.*, 1998).

Cara pencegahan yang lainnya, antara lain : menjauhkan diri dari sumber radiasi dengan memperhatikan jarak, lama terpajan radiasi, penggunaan pelindung terutama pada orang yang rentan seperti ibuhamil dan anak-anak; olahraga teratur membantu mengurangi stres; tidak merokok dan minum alkohol karena sebagai radikal bebas; mengubah cara membawa ponsel, tidak diletakkan dekat sistem reproduksi dan mengganti ponsel dengan jenis ponsel yang memiliki SAR rendah (EduMed, 2010).

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

1. Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, menurunkan kualitas(konsentrasi, motilitas, morfologi) dan fungsionalitas(apoptosis, jumlah kalsium intraseluler) spermatozoa manusia secara *in vitro*.
2. Semakin lama dan besar paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas dan fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro*.
3. Paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menghambat Ekspresi Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) pada spermatozoa dalam bentuk penutupan kanal kalsium.

B. Saran

1. Untuk pengembangan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dampak paparan radiasi ponsel yang bersifat reversibel /irreversibel, sebagai upaya preventif guna mencegah dampak lebih lanjut dari penggunaan ponsel terhadap kesehatan.
2. Untuk pengembangan perlu penelitian lebih lanjut khususnya dalam bidang klinik dengan melibatkan multisenter dan mengarah pada regulasi fertilitas sebagai antifertilitas dari dampak paparan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel.
3. Untuk pengamanan penggunaan ponsel, industri ponsel perlu memproduksi jenis ponsel yang mempunyai nilai SAR rendah.

4. Untuk kepentingan masyarakat sebagai konsumen, perlu pemerintah khususnya Departemen Kesehatandapat mempertimbangkan dalam pengambilan kebijakan yang berhubungan dengan dampak radiasi gelombang elektromagnetik dengan mengeluarkan peraturan untuk mengurangi risiko yang terkait dengan penggunaan ponsel.

I. PENDAHULUAN

Telepon seluler (ponsel) menjadi bagian penting dalam kehidupan modern, baik bagiorang tua, remaja, dan anak-anak. Penggunaan ponsel berlebihan menghasilkan polusi elektromagnetik (Frank&Jerome, 1980).Envirogenomik adalah pengetahuan berbasis biologi molekuler mempelajari interaksi gen dengan lingkungan (Tauhid, 2008), dan mempelajari penyakit berbasis lingkungan (Umar, 2011).

Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel merupakan bagian dari radiasi non-ionisasi. Ponsel beroperasi pada frekuensi yang berbeda-beda, sehingga radiasi yang ditimbulkan juga berbeda-beda tergantung intensitas, frekuensi, lama pajanan, dan sensitivitas jaringan yang terkena. Pancaran radiasi gelombang elektromagnetik bersifat melingkar sehingga dalam penggunaan ponsel (terutama di saku celana pada laki-laki) dapat mengenai sistem reproduksi (Agarwal *et al.*, 2011).

Bukti empirik dari penelitian menunjukkan bahwa kasus infertilitas laki-laki (17-25 % pasangan), 50 % disebabkan oleh faktor laki-laki(Agarwal *et al.*, 2011), dan penyebab tersering dihubungkan dengan degradasi lingkungan sertapajanan faktor risiko di tempat kerja. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gelombang elektromagnetik ponsel dapat mengurangi potensi kesuburan laki-laki dengan jenis dan derajat gangguan yang berbeda-beda (Davoudi *et al.*, 2002; Fejes *et al.*,2005; Erogul *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*,2007). Kajian *in vivomenunjukkankerusakan sel Leydig*, penurunan diameter tubulus seminiferus, penurunan berat adan fungsi organ testis yang berakibat terjadinya infertilitas (Kavindra *et al.*, 2011; Feyyaz *et al.*, 2011), menurunnya kualitas sperma berupa jumlah sperma, motilitas (Fejes *et al.*, 2005),viabilitas, dan morfologi, serta demodulasi DNA (dePomerai *etal.*, 2000).

Radiasigelombang elektromagnetik radiofrekuensiponsel berpengaruh terhadap kesehatan manusia melalui mekanisme utama pada membran plasma, salah satunya melalui *Voltage-Gated Calcium Channels* (GVCC), kemudian baru melalui jalur lainnya yaitu jalur apoptosis, jalur *heat shock protein*, jalur metabolisme radikal bebas, jalur diferensiasi sel, dan jalur kerusakan DNA.

Ekspresi GVCC untuk mengetahui kemampuan kanal Ca^{2+} dalam mengatur proses fisiologis sperma, dalam hal membuka atau menutupnya kanal kalsium, dapat dipengaruhi oleh beberapa bahan/zat antara lain : *Thapsigargin* (*inhibitor sarco-endoplasmic reticulum ATP-ase*) dapat menginduksi pelepasan Ca^{2+} dari penyimpanan internal (Blackmore, 1993; Meizel & Turner, 1993) di dalam reticulum endoplasma sel, *Progesteron* berfungsi dalam pembukaan kanal kalsium (Foresta & Rossato, 1997), *Verapamil* sebagai *Calcium channel blockers* bersifat menutup kanal kalsium, sehingga berefek pada penurunan fungsi spermatozoa.

Masalah Utama dalam penelitian ini adalah a. Apakah pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel mempengaruhi kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro* ? b. Apakah pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel mempengaruhi fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro* ? c. Apakah pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel mempengaruhi ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channels* spermatozoa manusia secara *in vitro* ?,

Tujuan umum penelitian *in vitro* ini adalah : a. Untuk mengungkapkan dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap kualitas spermatozoa manusia, b. Untuk mengungkapkan dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap fungsionalitas spermatozoa manusia, c. Untuk mengungkapkan dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channels* spermatozoa manusia.

Hipotesis penelitian ini adalah a. Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menurunkan kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*, b. Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menurunkan fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro*, c. Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menghambat Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa secara *in vitro*.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah Eksperimental Laboratorik dengan rancangan *pre-post test controlled group design*. Penelitian terdiri dua tahap, yaitu tahap pertama

untuk mengungkap dampak pajanan radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa dan tahap kedua untuk menunjukkan proses penutupan kanal kalsium akibat pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Faal FK UGM. Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Faal untuk kualitas spermatozoa, Laboratorium Patologi Klinik FK UGM untuk pemeriksaan apoptosis dan Ca^{2+} intraseluler dengan *flowcytometry* dan untuk pemeriksaan *immunocytochemistry* (ICC) berupa ekspresi VGCC di Laboratorium Histologi FK UGM Yogyakarta.

Subyek penelitian adalah spermatozoa yang berasal dari ejakulat seorang pria yang sudah mengalami skrining dari 15 orang didapatkan satu orang yang memenuhi kriteria inklusi berupa laki-laki, sehat, umur 20-30 tahun, tidak merokok, tidak ada riwayat menderita penyakit degeneratif, kencing manis (DM), dan hipertensi, bersedia mengisi *informed consent*, serta bersedia mematuhi peraturan penelitian. Untuk menjaga agar donor spermatozoa tetap dalam kondisi prima, dan untuk pengendalian bias maka donor sperma dikarantina dan diberi makanan tambahan berupa protein tinggi (telur rebus dua kali sehari selama 2 minggu) dan menjauhkan diri dari pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi selama dua minggu sebelum penelitian dilaksanakan. Pengambilan sampel semen dilakukan dengan selang waktu berjarak sekitar 5-7 hari. Dalam penelitian ini, subyek penelitian didapatkan dari sekali ejakulasi untuk sampel penelitian yang mempunyai spermatozoa normal menurut kriteria WHO(1999) yaitu : konsentrasi sperma $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ dan bentuk morfologi normal $\geq 30\%$. Semen diperoleh dengan cara masturbasi dan ditampung ke dalam botol kaca steril yang bermulut lebar setelah abstinencia 3-4 hari. Setelah likuifaksi 30 menit, semen diberi media washing bernutrisi *Bicarbonate and HEPES buffered medium* berisi human serum albumin (SpermRinse Vitrolife) 1 : 1, kemudian dilakukan analisis spermatozoa menurut kriteria WHO (1999).

Pada penelitian tahap pertama, subyek penelitian dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan duplikasi masing-masing 5, yaitu : kelompok 1 adalah

kelompok kontrol (kelompok yang tidak mendapat perlakuan apapun selama 1 jam); kelompok 2 adalah kelompok kontrol (kelompok yang tidak mendapat perlakuan apapun selama 2 jam); kelompok 3 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 2 W/kg selama 1 jam); kelompok 4 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 2 W/kg selama 2 jam); kelompok 5 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 5.7 W/kg selama 1 jam); kelompok 6 adalah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi ponsel dengan intensitas SAR 5.7 W/kg selama 2 jam)

Penentuan kelompok secara acak dengan memberikan volume yang sama pada tiap-tiap kelompok yaitu 150 μ L untuk tiap sumuran, ini juga berlaku untuk penelitian tahap kedua.

Pajanan radiasi bersumber dari ponsel GSM (*Global system for mobile Communications*) 900 MHz dalam keadaan bicara; pajanan akut adalah lama pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel selama kurang dari atau sama dengan satu jam dan pajanan kronik adalah lama pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel lebih dari atau sama dengan dua jam (Desai *et al.*, 2009); *Specific Absorption Rate* (SAR) adalah ukuran rata-rata energi radiofrekuensi yang diabsorpsi oleh tubuh, dalam penelitian ini, sebesar 2 W/kg dan 5,7 W/kg, sedangkan jarak antara antenna ponsel dengan tiap spesimen sekitar 0.8-1.8 cm (Mouradiet *al.*, 2011); alat ukur: *detection electromagnetic radiation*.

Parameter yang diukur adalah :

1. Kualitas spermatozoa berupa konsentrasi spermatozoa, motilitas, morfologi spermatozoa.
 - a. Konsentrasi spermatozoa adalah jumlah spermatozoa per unit volume semen ($\times 10^6/\text{mL}$ semen). Penghitungan menggunakan kamar hitung *improved Neubauer haemocytometer*. Pemeriksaan dilakukan sesuai panduan WHO (1999), satuan sel sperma juta/mL.

- b. Motilitas spermatozoa adalah persentase spermatozoa yang bergerak per unit area, cara pemeriksaan sesuai WHO (1999). Motilitas sperma dicatat dalam persentase dengan kategori 1) *Fast progressive*(A) 2) *Slow progressive*(B) 3) *Non-Progressive* (C) 4) *Non- motile*(D), dihitung dengan menggunakan kamar hitung *improved Neubauer haemocytometer*.
 - c. Morfologi sperma menggunakan pewarnaan HE dan diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000 x. Morfologi sperma sesuai kriteria WHO (1999), dengan menilai bentuk morfologi normal, kelainan kepala, kelainan leher, dan kelainan ekor spermatozoa. Morfologi spermatozoa kepala normal apabila memiliki kepala berbentuk oval dengan bagian anterior pucat (akrosom, 40-70% dari daerah kepala) dan gelap di daerah posterior.
2. Fungsionalitas spermatozoa pada penelitian ini dibatasi pada fungsi spermatozoa berupa jumlah sel apoptosis dan konsentrasi Ca^{2+} Intraseluler.
- c. Jumlah sel apoptosis adalah jumlah sel apoptosis yang dianalisis menggunakan *flowcytometry* untuk mengkonfirmasi adanya sel apoptosis setelah terpajan ponsel dengan pewarnaan *propidium iodide* (PI) dan *Annexin V Fluores staining*.
 - d. Jumlah Ca^{2+} intraseluler dianalisis menggunakan *flowcytometry* untuk mengkonfirmasi adanya Ca^{2+} intraseluler setelah terpajan ponsel dengan Ca^{2+} probe *Fluo-3 AM* dan *propidium iodide*(PI), satuan persentase Ca^{2+} intraseluler (%).
3. Ekspresi *Voltage- Gated Calcium Channel* (VGCC) adalah penilaian ekspresi VGCC berdasarkan hasil pemeriksaan *immunocytochemistry* (ICC) dengan reaksi antigen antibodi, ada 2 kategori, yaitu ekspresi VGCC (+) berarti kanal kalsium terbuka ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma atau ekspresi VGCC (-) berarti kanal kalsium tertutup ditandai dengan tidak berwarna coklat pada sitoplasmanya. Ekspresi VGCC yang diamati dihitung secara visual (dihitung lapangan pandang per 100 sel).

Analisis statistik untuk menilai perbedaan nilai rerata antar kelompok digunakan *Kruskal-Wallis* (uji non-parametrik), dilanjutkan dengan uji post hoc

yaitu dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda. Untuk menguji kekuatan hubungan ekspresi VGCC dengan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa digunakan uji statistik *Pearson correlation*.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ponsel adalah bagian penting dari setiap kehidupan modern manusia, dan diperlukan penelitian untuk mengevaluasi konsekuensi dari meningkatnya penggunaan *smartphone*. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat pengaruh pajanan radiasi ponsel terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa manusia dengan menghitung konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa serta menghitung jumlah sel apoptosis dan jumlah Ca intraseluler spermatozoa. Selain itu, juga untuk mengetahui apakah pajanan radiasi ponsel mempengaruhi ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa.

1. Pengaruh pajanan ponsel terhadap kualitas spermatozoa

Kualitas spermatozoa menurun karena pengaruh pajanan radiasi ponsel, hal ini dapat diketahui melalui mekanisme *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Oxidative stress* di induksi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) menyebabkan kerusakan spermatozoa. Jika ROS melebihi kadar antioksidan dalam tubuh, kelebihannya akan menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan–kerusakan sel yang disebut stres oksidatif. Tingginya ROS menyebabkan kerusakan spermatozoa, yang berakhir dengan infertilitas. Membran plasma spermatozoa mengandung *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA) yang mudah dirusak oleh ROS. Kadar ROS yang berlebihan menyebabkan disfungsi spermatozoa karena terjadinya peroksidasi lipid dan perubahan fungsi membran yang berakibat terhadap penurunan metabolisme spermatozoa, morfologi sperma, motilitas sperma dan fertilitas (Hamada *et al.*, 2011). ROS menyebabkan gangguan spermiogenesis sehingga dapat menghasilkan morfologi spermatozoa yang abnormal (Hamada *et al.*, 2011).

1.1. Pengaruh pajanan ponsel terhadap konsentrasi spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa cenderung menurun sebanding dengan bertambah lama penggunaan ponsel yaitu lama waktu

pajanan akut (1 jam) dan pajanan kronik (2 jam) serta besarnya dosis (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg). Penurunan konsentrasi spermatozoa pada pajanan selama 1 jam disebabkan oleh energi panas yang ditimbulkan dari radiasi gelombang elektromagnetik diserap spermatozoa (Tribuana, 2006). Peningkatan frekuensi menyebabkan peningkatan energi yang diserap oleh spermatozoa. Hal ini disebabkan suhu menjadi faktor merugikan yang bersifat reversibel terhadap produksi sperma (Jung & Schill, 2000), sehingga merupakan target penting terhadap efek termal pajanan radiasi ponsel (Dasdag *et al.*, 1999). Selain efek termal pajanan radiasi ponsel, radiasi ponsel juga memiliki emisi radiasi yang bersifat melingkar, hal ini menyebabkan pada saat pemberian intervensi pajanan radiasi, spermatozoa bergerak ke tepi petri dish sehingga pada saat penghitungan konsentrasi spermatozoa seolah-olah konsentrasinya berkurang. Hal ini ditunjukkan pada pajanan 2 jam konsentrasi spermatozoa sama baik pada dosis 2 W/kg maupun 5.7 W/kg.

Pada keadaan *in vivo*, proses spermatogenesis pada testis manusia membutuhkan suhu fisiologis 2° C lebih rendah dari suhu tubuh optimal, jarak testis dengan sumber radiasi, serta konduksi pada permukaan aliran darah. Bila testis berada pada suhu yang lebih tinggi (> 2⁰C) akan terjadi degenerasi tubulus dan spermatogenesis terhambat secara parsial atau total yang pada akhirnya terjadi infertilitas (Ganong, 2003). Testis merupakan organ superfisial sehingga menyerap lebih banyak energi daripada organ lainnya. Efek termal yang dipancarkan ponsel pada SAR <2 W/ kg tidak ada pengaruhnya terhadap spermatozoa (Yan *et al.*, 2007; Anderson & Rowley, 2007), namun pada SAR >4 W /kg bisa menghasilkan kenaikan suhu 1°C.

1.2. Pengaruh pajanan ponsel terhadap motilitas spermatozoa

Motilitas sperma mempunyai peranan penting dalam mencapai ovum wanita sehingga gangguan motilitas sperma sering menjadi salah satu penyebab infertilitas pria. Hasil penelitian menunjukkan terdapat korelasi negatif antara rerata persentase jumlah motilitas kriteria *slow progressive* (B) dengan peningkatan penggunaan ponsel. Sedangkan untuk motilitas kriteria *non-*

progressive(C) dan *non-motile* (D) berkorelasi positif dengan peningkatan penggunaan ponsel. Hal ini sesuai dengan penelitian de Iuliis (2009) dan Eroglu *et al.* (2006) bahwa setelah terpajan radiasi ponsel terjadi penurunan motilitas *rapid progressive* (A) dan *slow progressive* (B) spermatozoa manusia dan peningkatan motilitas *non-progressive*(C) dan *non-motile* (D).

Kapasitasi spermatozoa yaitu kemampuan spermatozoa untuk menyimpan energi untuk bergerak. Proses kapasitasi melibatkan dua komponen yaitu meningkatkan kecepatan gerak spermatozoa dan mempermudah persiapan spermatozoa mengalami reaksi akrosom (Ganong, 2003). Selain itu mitokondria menjadi organel penting yang berhubungan dengan motilitas spermatozoa. Mitokondria adalah organel sel eukariot yang berfungsi sebagai organ respirasi pembangkit energi dengan menghasilkan adenosin triphosphat (ATP). Jumlah mitokondria tiap sel tergantung jenis sel dan organisme. Mitokondria ditemukan dalam jumlah banyak pada sel yang memiliki aktivitas metabolisme tinggi yaitu sel-sel kontraktil seperti spermatozoa. Ekor sperma merupakan alat gerak yang membutuhkan energi tinggi dari mitokondria yang banyak didapatkan pada bagian leher (Ganong, 2003).

Motilitas sperma yang rendah, dapat menjadi penyebab keadaan infertilitas pria (Jensen *et al.*, 2011). Hal ini dapat dijelaskan bahwa pajanan radiasi ponsel menghasilkan arus listrik bermuatan negatif saat melewati membran sel, sedangkan tubuh berperan sebagai antena menyerap radiasi ponsel dan mengubahnya menjadi *alternating eddy currents*. Kation seperti Ca^{2+} dan Mg^{2+} mengikat secara alami dengan membran sel berisi protein fosfolipid bermuatan negatif, dan mengganggu stabilitas sel membran (Goldsworthy, 2007), mendorong ion kalsium (*Ca efflux*) dan merusakkan membran sel (Goldsworthy, 2007), sehingga Ca^{2+} habis digantikan oleh kalium yang membuat membran sel lemah dan bocor, karena kalium memiliki kemampuan terbatas untuk menstabilkan membran. Kerusakan pada membran plasma menyebabkan gangguan motilitas spermatozoa yang dapat dilihat dalam berbagai penelitian (Alavi & Cosson, 2006).

Dalam penelitian ini didapatkan data bahwa motilitas kriteria *non-progressive*(C) dan *non-motile* (D) berkorelasi positif dengan peningkatan intensitas penggunaan ponsel. Semakin besar intensitas pajanan radiasi ponsel, semakin banyak spermatozoa yang mengalami gangguan motilitas berupa tidak bergerak progresif dan bahkan tidak bergerak sama sekali. Hal ini dikarenakan bahwa pajanan radiasi ponsel mempengaruhi membran plasma di bagian leher sperma dimana terdapat banyak mitokondria yang berguna sebagai sumber energi untuk motilitas sperma. Apabila mitokondria mengalami kerusakan berarti motilitas spermatozoa juga terganggu (Ahmad & Baig,2011).

Pajanan radiasi ponsel menyebabkan terjadinya kenaikan ROS, yang merupakan salah satu bentuk radikal bebas yang memiliki reaktivitas sangat tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan sifatnya yang segera menarik atau menyerang elektron di sekitarnya yang dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya diambil. Target utama radikal bebas adalah protein, lipoprotein, unsur DNA termasuk karbohidrat dan terutama asam lemak tak jenuh atau *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA) yang merupakan komponen membran plasma pada spermatozoa yang mudah diserang oleh ROS. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang dapat berefek terhadap penurunan kualitas dan fungsionalitas spermatozoa sehingga merupakan salah satu faktor risiko infertilitas pria (Hamada *et al.*, 2011).

Dalam penelitian ini didapatkan sel lain selain spermatozoa yaitu leukosit, hal ini mempengaruhi *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) melalui mekanisme gangguan pada integritas mitokondrial (komponen utamanya phospholipid) berupa proses lipid peroksidasi yaitu jika asam lemak phospholipid dioksidasi oleh radikal bebas (*stress oksidatif*) menghasilkan radikal bebas dan peningkatan produksi ROS spermatozoa (Kesari *et al.*, 2011) oleh rangsangan NADH oksidase dan terjadi pengurangan produksi ATP, maka terjadi peningkatan konsentrasi MDA dan potensial membran mitokondria akan mengalami gangguan yang berakibat terjadi kelainan pada motilitas spermatozoa berupa penurunan persentase *fast progressive* motilitas dan menaikkan persentase *non-motile* spermatozoa (Falzone *et al.*, 2010;Ahmad & Baig,2011;Agarwal *et al.*, 2009;

Agarwal *et al.*, 2003). Peningkatan produksi ROS akan mengurangi aktivitas Protein Kinase C (PKC). PKC terlokalisasi di segmen equatorial sperma dan di *principal piece* flagel sehingga berperan terhadap motilitas sperma (Rotem *et al.*, 1990). Sumber radikal bebas bertanggung jawab menghasilkan stres pada mitokondria yang menyebabkan terjadinya apoptosis melalui jalur nitrit (Koppers *et al.*, 2008). Kelebihan ROS terdeteksi dengan adanya leukosit (Falzone *et al.*, 2010).

Pada pajanan akut, radiasi ponsel menyebabkan peningkatan lipid peroksida pada membran sperma yang mengandung PUFA melalui peningkatan produksi ROS, sehingga merangsang aktivitas enzim oksidase membran NADH plasma, dan menurunkan produksi ATP, yang ditandai dengan peningkatan konsentrasi MDA (Ahmad & Baig, 2011; Friedman *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2009). Hal ini akan merusak biomolekul termasuk fragmentasi DNA, enzim, lipid, dan protein (De Iuliis *et al.*, 2009) sehingga menyebabkan terjadinya penurunan persentase motilitas kriteria *slow progressive* (C) dan peningkatan persentase motilitas kriteria *non-motile* (D). Sedangkan pada pajanan radiasi ponsel secara kronik, berkaitan dengan kelebihan ROS, menyebabkan aktivasi *heat shock protein* (hsp) sebagai respon pelindung. Tugas hsp adalah bergabung dengan enzim penting, membentuk lapisan pelindung di sekitar enzim, untuk melindungi dari kerusakan, namun aktivasi hsp tidak dapat untuk melindungi dari semua stres, sehingga dapat mempengaruhi metabolisme sperma. *Heat shock protein* (hsp) menstabilkan endotel serat stres dan mengubah sekresi *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas *bloodbarier* testis dan penyebab infertilitas (Desai *et al.*, 2009).

Berdasarkan penelitian ini, dapat dikatakan bahwa peningkatan risiko stres oksidatif dalam spermatozoa karena radiasi elektromagnetik ponsel adalah nyata, namun beban risiko ini ditentukan oleh durasi penggunaan ponsel, frekuensi radiasi ponsel, SAR dan jarak dengan organ reproduksi pria.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ada penurunan persentase jumlah motilitas kriteria *slow progressive* (B) dengan peningkatan penggunaan ponsel. Sedangkan untuk motilitas kriteria *non-progressive*(C)*non-motile* (D)

berkorelasi positif dengan peningkatan penggunaan ponsel akibat pajanan radiasi elektromagnetik ponsel seiring dengan peningkatan lama dan intensitas pajanan radiasi ponsel. Ini sesuai dengan hipotesis peneliti yaitu semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*, dalam hal ini terhadap persentase jumlah motilitas kriteria spermatozoa *slow progressive* (B), *non-progressive* (C) dan *non-motile* (D).

1.3. Pengaruh pajanan ponsel terhadap morfologi spermatozoa

Lama waktu pajanan (akut dan kronik) dan besarnya dosis (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg) berpengaruh terhadap rerata persentase morfologi normal spermatozoa yaitu semakin lama dan semakin besar intensitas radiasi ponsel, rerata persentase morfologi normal spermatozoa semakin berkurang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wdowiak *et al.*, (2007) yang mencatat terjadi peningkatan signifikan persentase sel sperma abnormal morfologi yang berhubungan dengan durasi pajanan radiasi ponsel. Dalam penelitian ini abnormalitas spermatozoa terjadi akibat radikal bebas pada pajanan radiasi ponsel. Hal ini dapat dilihat antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, dimana terjadi penurunan jumlah morfologi spermatozoa normal pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel. Sesuai dengan pendapat Hamada *et al.* (2011), bahwa meningkatnya abnormalitas morfologi dapat disebabkan adanya radikal bebas yang berasal dari radiasi ponsel.

Dalam penelitian ini, lama waktu pajanan (akut dan kronik) serta besarnya dosis (SAR 2 W/kg dan 5.7 W/kg) tidak berpengaruh terhadap rerata persentase kelainan morfologi kepala. Dalam penelitian ini, rerata persentase kelainan morfologi kepala sama pada kelompok kontrol dan pajanan radiasi ponsel sehingga terjadinya kelainan morfologi kepala kemungkinan dikarenakan efek termal dari radiasi yang menyebabkan stres fisik spermatozoa sehingga mempengaruhi membrane plasma spermatozoa dengan akibat terjadi kelainan morfologi kepala berupa kepala kecil dan pyriform.

Semakin lama dan semakin besar intensitas radiasi ponsel, rerata persentase kelainan morfologi kelainan leher spermatozoa, rerata persentase

morfologi kelainan ekor spermatozoa dan rerata persentase morfologi kelainan sitoplasma spermatozoa semakin bertambah. Paparan radiasi ponsel menyebabkan produksi radikal bebas meningkat pada kondisi *in vitro*. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sifatnya tidak stabil sehingga untuk memperoleh pasangan elektron, molekul ini cenderung bersifat sangat reaktif dan korosif bagi sel sehat. Jumlah radikal bebas yang berlebihan menyebabkan kerusakan membran spermatozoa akibat terbentuknya lipid peroksida pada membran plasma (Hamada *et al.*, 2011). Membran plasma spermatozoa mengandung fosfolipid dan asam lemak tak jenuh dalam jumlah besar, dimana asam lemak tak jenuh ini sangat rentan terhadap serangan radikal bebas, terutama radikal hidroksil, sehingga ROS dapat dengan mudah menembus masuk membran plasma. Radikal hidroksil itu akan menimbulkan reaksi rantai yang disebut peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik terhadap spermatozoa (Gye & Park, 2012). Hal ini akan menghasilkan morfologi spermatozoa yang abnormal.

Sedangkan secara *in vivo*, hal ini terjadi karena pengaruh paparan radiasi ponsel dapat mempengaruhi sintesis hormon testosteron melalui dua mekanisme. Mekanisme pertama mengganggu aktivitas enzim adenil siklase pada membran sel Leydig (secara intra testikuler) sehingga mengakibatkan terhambatnya sintesis hormon testosteron. Mekanisme kedua menstimulasi medula adrenal (secara ekstra testikuler) untuk melepaskan katekolamin. Katekolamin dapat mempengaruhi sistem saraf pusat sehingga dapat mengganggu proses spermatogenesis dan sintesis hormon testosteron melalui mekanisme umpan balik antara hipotalamus-hipofisis anterior-testis. Hormon testosteron berperan dalam maturasi spermatozoa di epididimis (Amarudin, 2012). Penurunan kadar testosteron menyebabkan proses spermiogenesis tidak berjalan optimum sehingga menurunkan kualitas termasuk morfologi spermatozoa. Oleh karena itu abnormalitas morfologi terjadi pada proses spermatogenesis yaitu pada tahap spermiogenesis yang mengakibatkan terganggunya fungsi enzim dan mekanisme kerja hormon dalam pembentukan spermatozoa (Hamada *et al.*, 2011; Otitolaju *et al.*, 2010).

Hasil pengamatan mikroskopis spermatozoa yang mendapat pajanan radiasi ponsel terlihat adanya sel spermatozoa yang tidak normal yaitu tidak adanya ekor atau kepala, kepala kecil, ekor melipat, ekor putus dibagian tengah, yang menunjukkan sel-sel tersebut mengalami degenerasi. Abnormalitas pada morfologi spermatozoa ini terdiri dari abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer dapat terjadi karena kelainan pada saat proses spermatogenesis yang terjadi di tubuli seminiferi, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi kerusakan spermatozoa selama perjalanan melalui epididimis, selama fase ejakulasi atau setelah ejakulasi terjadi atau kesalahan dalam preparasi preparat(Amarudin, 2012).

Kelainan abnormal kepala spermatozoa terjadi pada saat spermatogenesis (*in vivo*). Spermatogenesis dapat terjadi melalui beberapa tahap pembelahan. Tahap awal, spermatogonia mengalami perubahan menjadi spermatosit primer, kemudian menjadi spermatosit sekunder dan menjadi spermatid. Sebelum spermatid menjadi spermatozoa ada fase yang dilewati spermatid yang disebut fase spermiogenesis. Fase ini terdiri dari fase golgi, tutup, akrosom dan pematangan bertujuan untuk membentuk morfologi normal spermatozoa yang terdiri dari kepala, leher dan ekor. Gangguan kelainan ini bisa disebabkan oleh akibat hormonal, radikal bebas dan bahan suplemen makanan (Gye & Park, 2012).Radikal bebas menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Membran sel ini sangat penting bagi fungsi reseptor dan fungsi enzim, sehingga terjadinya peroksidasi lipid mengakibatkan hilangnya fungsi seluler secara total (Amarudin, 2012). Gangguan pada saat spermatogenesis ini terjadi akibat kekurangan energi, hal ini karena pajanan radiasi ponsel dapat mengubah mekanisme kerja hormon dan enzim yang mengatur motilitas dan morfologi sperma.

Pada kepala dan ekor spermatozoa dihubungkan oleh membran sel sehingga memungkinkan terjadinya pemisahan selama pergerakan sel dan perpindahan sitoplasma. Pada spermatozoa yang mengalami abnormalitas pada bagian posterior kepala, kadang tidak terbentuk membran yang sempurna sehingga kontak dengan basal ekor kurang kuat, hal ini karena kerusakan

membran spermatozoa oleh ROS dan peroksidasi lipid asam lemak tak jenuh pada kepala dan leher spermatozoa menyebabkan perubahan morfologi spermatozoa (Gye & Park, 2012).

Kelainan morfologi ekor spermatozoa berupa ekor yang tergulung atau lepas terjadi apabila radikal bebas yang terbentuk bertemu dengan asam lemak tak jenuh dalam membran sel, sehingga terjadi reaksi peroksidasi lipid membran sel yang mengakibatkan peningkatan fluiditas membran, gangguan integritas membran dan inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Hal ini akan menyebabkan peningkatan kerusakan sel spermatozoa (Amarudin, 2012). Apabila produksi ATP mitokondria rendah dan ATP intraseluler berkurang dengan cepat berakibat pada kerusakan aksonema, penurunan viabilitas spermatozoa, meningkatnya kerusakan morfologi midpiece, kehilangan kemampuan kapabilitas dan reaksi akrosom spermatozoa serta adanya hambatan pergerakan spermatozoa. Hal ini akan meningkatkan kelainan ekor spermatozoa akibat rendahnya ATP mitokondria oleh radikal bebas dari pajanan radiasi ponsel (Ahmad & Baig, 2011; Hamada *et al.*, 2011).

Untuk spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher, ekor dan sitoplasma berkorelasi positif dengan peningkatan penggunaan ponsel akibat pajanan radiasi elektromagnetik ponsel seiring dengan peningkatan lama dan intensitas pajanan radiasi ponsel. Ini sesuai dengan hipotesis peneliti yaitu semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia secara *in vitro*, dalam hal ini terhadap rerata persentase spermatozoa yang mempunyai kelainan morfologi leher, ekor dan sitoplasma.

Penggunaan ponsel mempengaruhi kualitas spermatozoa dengan menurunkan konsentrasi spermatozoa, meningkatkan immotilitas dan meningkatkan kelainan morfologi spermatozoa, yang berhubungan dengan infertilitas pria. Hal ini sesuai dengan hipotesis peneliti bahwa semakin lama dan semakin besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas spermatozoa manusia.

2. Pengaruh Pajanan Ponsel terhadap Fungsionalitas Spermatozoa

Radiasi ponsel menyebabkan perubahan pada ROS, dan aktivitas enzim antioksidan (Kesari *et al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2010). Moustafa *et al.* (2001) menunjukkan bahwa terdapat penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti *superoksida dismutase* dan *glutathion peroksidase* eritrosit manusia yang terpajan radiasi ponsel (Oral *et al.*, 2006; Balci *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). Penurunan aktivitas SOD menunjukkan peningkatan generasi ion superoksida reaktif. Induksi pajanan radiasi ponsel menyebabkan *stress oksidatif* yang bermanifestasi terjadinya perubahan kompleks enzim PKC pada tubulus seminiferus dan sel Leydig. Antioksidan seperti melatonin, asam caffeic, fenil ester, vitamin C, dan vitamin E mencegah *stress oksidatif* atau apoptosis yang disebabkan oleh radiasi ponsel di berbagai jaringan hewan (Oktem *et al.*, 2006; Ozguner *et al.*, 2006; Oral *et al.*, 2006).

2.1. Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah sel spermatozoa yang mengalami apoptosis

Pada pemeriksaan apoptosis dengan *flowcytometry*, peneliti tidak melakukan sentrifugasi (pemusingan) dengan alasan bahwa sentrifugasi menyebabkan rendahnya hasil motilitas disebabkan kerusakan integritas membran. Susilawati (2011), menyebutkan bahwa sexing dengan cara sentrifugasi mengakibatkan kerusakan membran secara struktural.

Hasil penelitian didapatkan bahwa rerata persentase spermatozoa yang mengalami apoptosis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat pajanan radiasi didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dimana rerata persentase jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis lebih tinggi pada kelompok yang terpajan radiasi dibanding kelompok kontrol. Hal ini dikarenakan pajanan radiasi ponsel menyebabkan perubahan homeostasis kalsium dengan konsekuensi mempengaruhi pada jalur metabolisme makromolekul seluler. Pajanan radiasi ponsel menginduksi perubahan membran plasma potensial dan kalsium efflux dengan akibat terjadi pengurangan kalsium yang dihasilkan sehingga menyebabkan penurunan aktivitas protein kinase C (PKC). Penurunan ini menyebabkan perubahan pada enzim, pompa ion, saluran dan protein serta mendorong terjadinya apoptosis serta perubahan serum testosteron, ekspresi

mRNA untuk enzim pertama dalam steroidogenesis di sel Leydig (Zhou *et al.*, 2005).

Hasil penelitian peneliti menunjukkan bahwa ada korelasi positif antara apoptosis dengan motilitas kriteria *non-progressive* (C) spermatozoa ($p=0.046$; $r=0.348$) dimana semakin banyak spermatozoa yang mengalami apoptosis, maka semakin meningkat juga jumlah spermatozoa yang memiliki motilitas kriteria *non-progressive* (C). Hal ini sesuai dengan penelitian Paasch *et al.* (2004) dan Marchetti *et al.* (2004a) bahwa komponen sinyal *cascade* apoptosis berkorelasi kuat dengan motilitas sperma dan morfologi spermatozoa (Aziz *et al.*, 2007) serta kemampuan fertilisasi spermatozoa manusia (Said *et al.*, 2006; Grunewald *et al.*, 2007). Penelitian Aziz *et al.* (2007) menunjukkan bahwa selama apoptosis, kelainan pada ekor spermatozoa terjadi dikarenakan *positive annex* yang membuat gerakan ekor menjadi sulit. Hasil penelitian Sakkas *et al.* (1999) juga menunjukkan bahwa individu dengan tingkat apoptosis tinggi memiliki persentase peningkatan sperma dengan kerusakan genetik dan jumlah sperma immotil yang lebih tinggi pula.

2.2. Pengaruh pajanan ponsel terhadap jumlah kalsium intraseluler spermatozoa

Hasil penelitian didapatkan perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol dengan pajanan 2 W/kg selama 1 jam ($p<0.05$), sedangkan pada pajanan 2 jam tidak ada perbedaan yang bermakna ($p>0.05$), juga terjadi pada kelompok pajanan 5.7 W/kg. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pajanan selama 1 jam dapat mempengaruhi rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa baik pada dosis 2 W/kg maupun dosis 5.7 W/kg. Sedangkan kelompok kontrol yang diberi verapamil, thapsigargin, dan progesterone mempengaruhi rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa setelah terpajan selama 2 jam.

Dilihat dari rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa pada kondisi *in vitro* terjadi kecenderungan penurunan jumlah kalsium mendekati rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa kelompok kontrol pada kelompok yang mendapat pajanan radiasi ponsel 2 W/kg dan 5.7 W/kg, kelompok

verapamil dan thapsigargin, kecuali kelompok progesterone yang terjadi kenaikan rerata persentase jumlah kalsium intraseluler spermatozoa dibanding kelompok control. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penutupan kanal kalsium pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel, kelompok thapsigargin dan kelompok verapamil sehingga jumlah kalsium intraseluler spermatozoa pada kelompok tersebut berkurang.

Pada kelompok progesterone terjadi peningkatan jumlah kalsium intraseluler karena sifat progesterone yang membuka kanal kalsium sehingga kalsium dari luar sel akan masuk ke dalam sel. Ion kalsium sebagai *messenger* intraseluler terpenting dalam mengatur motilitas sperma yang dimediasi oleh kanal Ca^{2+} , dapat menurunkan aktivitas sperma.

3. Pengaruh pajanan radiasi ponsel terhadap ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa

Kalsium adalah salah satu molekul *secondary messenger*. Protein kinase C (PKC) adalah salah satu jalur yang berhubungan dengan *secondary messenger* dan merupakan keluarga enzim yang terlibat dalam mengendalikan fungsi pompa protein lainnya dan kanal melalui fosforilasi gugus hidroksil serin dan residu asam amino treonin protein (Larsson, 2008). Enzim PKC diaktifkan oleh sinyal seperti peningkatan konsentrasi diasilgliserol atau Ca^{2+} . Oleh karena itu enzim PKC memainkan peran penting di beberapa kaskade transduksi sinyal seperti mediasi respon seluler terhadap rangsangan ekstraseluler dalam proliferasi, diferensiasi, apoptosis, dan pengeluaran exocytotic di sejumlah sel non saraf dan sel sperma (Naor & Breitbart, 1997).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok yang terpajan radiasi ponsel, dan kelompok verapamil mempunyai ekspresi VGCC jumlahnya sedikit maka hal ini menunjukkan bahwa pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel dapat menurunkan ekspresi VGCC sehingga dapat dikatakan bahwa pajanan radiasi ponsel menyebabkan ekspresi VGCC /kanal kalsium menutup sesuai hasil penelitian pada kelompok yang mendapat intervensi verapamil dimana verapamil berfungsi sebagai *blocker* kanal kalsium.

Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis bahwa pemberian progesteron secara signifikan meningkatkan kualitas parameter sperma sebaik ekspresi gen *CatSper*, sehingga ada perbedaan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa yang mendapat intervensi pajanan radiasi ponsel, verapamil, thapsigargin, dan progesterone, dimana pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menurunkan ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) spermatozoa manusia.

Ada hubungan antara ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel* (VGCC) pada spermatozoa dengan kualitas spermatozoa (konsentrasi sel $p=0.003$; $r=0.361$; motilitas B $p=0.000$; $r=0.664$; motilitas D $p=0.000$, $r= -0.660$; morfologi normal $p=0.000$; $r=0.634$; morfologi kelainan ekor $p=0.008$, $r= -0.324$) dan fungsionalitas spermatozoa (apoptosis $p=0.039$; $r=0.257$) setelah terpajan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel. Artinya semakin banyak ekspresi VGCC di dapat berarti semakin banyak kanal kalsium yang bersifat terbuka, sehingga semakin baik kualitas (konsentrasi, morfologi, motilitas) dan fungsionalitas (apoptosis, Ca intraseluler) spermatozoanya. Hal ini karena ekspresi VGCC (*CatSper*) adalah kanal ion kalsium pertama yang berhubungan dengan motilitas dan hiperaktivasi. Kekurangan *CatSper* seperti pada saat pemberian verapamil dan akibat pajanan radiasi ponsel bersifat menutup kanal kalsium menyebabkan terjadinya infertil sebagai hasil dari gangguan pada motilitas sperma dan ketidakmampuan untuk membuahi pada oocyt yang utuh (Hong-Gang *et al.*, 2006).

IV. PENUTUP

1. Simpulan

Simpulan dari penelitian ini adalah :

- 1.1. Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel,
menurunkan kualitas (konsentrasi, motilitas, morfologi) dan
fungsionalitas (apoptosis, jumlah kalsium intraseluler) spermatozoa manusia
secara *in vitro*,

- 1.2.Semakin lama dan besar pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel, semakin rendah kualitas dan fungsionalitas spermatozoa manusia secara *in vitro*,
- 1.3.Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel menghambat Ekspresi *Voltage-Gated Calcium Channel*(VGCC) pada spermatozoa dalam bentuk penutupan kanal kalsium.

2. Saran

- 2.1.Untuk pengembangan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dampak pajanan radiasi ponsel yang bersifat reversibel / irreversible, sebagai upaya preventif guna mencegah dampak lebih lanjut dari penggunaan ponsel terhadap kesehatan.
- 2.2.Untuk pengembangan perlu penelitian lebih lanjut khususnya dalam bidang klinik dengan melibatkan multisenter dan mengarah pada regulasi fertilitas sebagai antifertilitas dari dampak pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radiofrekuensi ponsel.
- 2.3.Untuk pengamanan penggunaan ponsel, industri ponsel perlu memproduksi jenis ponsel yang mempunyai nilai SAR rendah.
- 2.4.Untuk kepentingan masyarakat sebagai konsumen, perlu pemerintah khususnya Departemen Kesehatan dapat mempertimbangkan dalam pengambilan kebijakan yang berhubungan dengan dampak radiasi gelombang elektromagnetik dengan mengeluarkan peraturan untuk mengurangi risiko yang terkait dengan penggunaan ponsel.

Cellular phones (mobile phones) become an essential part of modern life, both for parents, teens, and children. Excessive use of mobile phones generate electromagnetic pollution (Frank & Jerome, 1980). Envirogenomic is a knowledge-based molecular biology study the interaction of genes with the environment (Tauhid, 2008), and studying the environment-linked diseases (Umar, 2011).

Exposure to radio frequency electromagnetic wave radiation phone is a part of the non-ionizing radiation. Mobile phones operate on different frequencies, so that the radiation generated also varies depending on the intensity, frequency, duration of exposure, and the sensitivity of the tissue. Radiation emitting electromagnetic waves is circular so that the use of mobile phones (especially in his trouser pocket on men) may affect the reproductive system (Agarwal et al., 2011).

Empirical evidence from the study showed that cases of male infertility (17-25% of couples), 50% are caused by male factors (Agarwal et al., 2011), and the most common cause associated with environmental degradation and exposure to risk factors in the workplace. Some studies show that electromagnetic waves of mobile phones can reduce the potential fertility of men with type and degree of hearing the different (Davoudi et al., 2002; Fejes et al., 2005; Eroglu et al., 2006; Agarwal et al., 2007). Studies *in vivo* show damage Leydig cells, decreasing the diameter of the seminiferous tubules, weight loss and organ function testicle that results in infertility (Kavindra et al., 2011; Feyyaz et al., 2011), decreased sperm quality such as sperm concentration, motility (Fejes et al., 2005), viability, and morphology, as well as DNA demodulation (dePomerai et al., 2000).

Electromagnetic waves of radio frequency mobile phones can affect human health through the primary mechanism to the plasma membrane, one through Voltage-Gated Calcium Channels (VGCC), then just through other channels, namely apoptosis pathway, lane heat shock protein, the metabolic pathway of free radicals, differentiation pathway cell and DNA damage pathways. Expression VGCC to determine the ability of Ca^{2+} channels in regulating physiological processes of sperm, in terms of opening or closing calcium

channels, can be influenced by some of the ingredients / substances include: Thapsigargin (inhibitor Sarco-endoplasmic reticulum ATPase) can induce the release of Ca^{2+} from internal storage (Blackmore, 1993; Meizel & Turner, 1993) in the endoplasmic reticulum of cells, Progesterone serves in the opening of calcium channels (Foresta & Rossato, 1997), Verapamil as calcium channel blockers are closing calcium channels, so that the effect on sperm function decline.

Key issues in this study is a. Does exposure to radiofrequency electromagnetic waves mobile phone radiation affects human sperm quality in vitro? b. Does exposure to radiofrequency electromagnetic waves mobile phone radiation affects the functionality of human spermatozoa in vitro? c.Does exposure to radiofrequency electromagnetic waves mobile phone radiation affects the expression of Voltage-Gated Calcium Channel of human spermatozoa in vitro?,

The general objective of this in vitro study are: a. To reveal the impact of radiation exposure to radiofrequency electromagnetic waves mobile phones on the quality of human spermatozoa, b. To reveal the effects of exposure to radiofrequency electromagnetic radiation cell phone about the functionality of the human spermatozoa, c.To reveal the impact of radiation exposure to radio frequency electromagnetic waves mobile phones on the expression of Voltage-Gated Calcium Channel of human spermatozoa.

The hypothesis of this study is a.Exposure radio frequency electromagnetic wave radiation phones degrade the quality of human spermatozoa in vitro, b.Exposure phone radiofrequency electromagnetic wave radiation lowers the functionality of human spermatozoa in vitro, c. Exposure to radiofrequency electromagnetic wave radiation inhibits cell phone Expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) spermatozoa in vitro.

II. METHOD

This study was laboratory experimental design with pre-post test controlled group design. The study consisted of two stages: the first stage to disclose the impact of exposure to mobile phone radiation on sperm quality and functionality, and the

second stage to show the process of closure of calcium channels as a result of exposure to radiofrequency electromagnetic waves mobile phone radiation on the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) on spermatozoa.

The study was conducted at the Laboratory of Physiology of the Faculty. Tests conducted in laboratory samples for quality spermatozoa, Clinical Pathology Laboratory of the Faculty for examination of apoptosis and intracellular Ca^{2+} by flowcytometry and for examination of immunocytochemistry (ICC) in the form of expression VGCC in Histology Laboratory of the Faculty of Yogyakarta.

Subjects were ejaculated spermatozoa coming from a man who has experienced the screening of 15 people found the people who met the inclusion criteria be male, healthy, age 20-30 years old, no smoking, no history of suffering from degenerative diseases, diabetes (DM), and hypertension, are willing to fill informed consent, and are willing to abide by the rules of research. To keep donor spermatozoa remain in prime condition, and for the control of bias, the donor sperm is quarantined and given supplementary food high protein (boiled eggs twice a day for 2 weeks) and keep away from exposure to radiation elektromagnetik radiofrequency during the two weeks prior to the study carried out. Sampling was carried out at intervals of cement is about 5-7 days. In this study, obtained from the study subjects once ejaculation for the study sample that has a normal sperm according to WHO criteria (1999), namely: the sperm concentration of $> 20 \times 10^6 / \text{mL}$ and normal morphology of $> 30\%$. Semen was obtained by masturbation and placed into sterile glass bottles are wide-mouthed after abstinencia 3-4 days. After 30 minutes of liquefaction, semen washing nutritive media were given bicarbonate and HEPES buffered medium containing human serum albumin (SpermRinse Vitrolife) 1: 1, then analysis of sperm according to WHO criteria (1999) ..

In the first stage of research, the study subjects were grouped into 6 groups with each duplication 5, namely: Group 1 was the control group (those not receiving any treatment for 1 hour); Group 2 was the control group (those not receiving any treatment for 2 hours); Group 3 is the treatment group (treatment group who received radiation exposure to the intensity of cell phone SAR 2 W /

kg over 1 hour); Group 4 is the treatment group (treatment group who received radiation exposure to the intensity of cell phone SAR 2 W / kg for 2 hours); Group 5 is the treatment group (treatment group that received cell phone radiation exposure to the intensity of SAR 5.7 W / kg over 1 hour); Group 6 is the treatment group (treatment group that received cell phone radiation exposure to the intensity of SAR 5.7 W / kg for 2 hours) Determination groups randomly by providing the same volume in each group of 150 mL for each of the wells, this also applies to the second phase of the study.

The radiation exposure originating from mobile GSM (Global System for Mobile Communications) 900 MHz in a state to talk; Acute exposure is long exposure to radiofrequency electromagnetic radiation of mobile phones for less than or equal to one hour and chronic exposure is long exposure to radiofrequency electromagnetic radiation cell phone is more than or equal to two hours (Desai et al, 2009); Specific Absorption Rate (SAR) is the average size of radiofrequency energy absorbed by the body, in this study, of 2 W / kg and 5.7 W / kg, while the distance between the antenna phone with each specimen approximately 0.8-1.8 cm (Mouradi et al., 2011); measuring devices: electromagnetic radiation detection.

Parameters measured were:

1. Quality of spermatozoa in the form of sperm concentration, motility, morphology of spermatozoa.

- a. Sperm concentration is the number of sperm per unit volume of semen (x 10⁶ / mL of semen). Calculations using the improved Neubauer haemocytometer counting chamber. Inspection carried out according to the guidelines of WHO (1999), a unit of sperm cells million / mL.
- b. Motility is the percentage of spermatozoa moving per unit area, means an inspection according to WHO (1999). Sperm motility is recorded in percentage by category 1) Fast progressive (A) 2) Slow progressive (B) 3) Non-Progressive (C) 4) Non-motile (D), calculated using the improved Neubauer haemocytometer counting chamber.

c. Sperm morphology using HE staining and observed with a light microscope magnification 1000 x. Sperm morphology according to WHO criteria (1999), by assessing normal morphology, abnormalities of the head, neck disorders, and abnormalities of the sperm tail. Normal morphology of spermatozoa head if it has a head shaped oval with pale anterior part (acrosome, 40-70% of the area of the head) and dark in the posterior region.

2.Functionality spermatozoa in this study is limited to the function of spermatozoa in the form of the number of apoptotic cells and concentrations Intracellular Ca²⁺.

- a. The number of apoptotic cells is the number of apoptotic cells were analyzed using flowcytometry to confirm the presence of apoptotic cells after exposure to staining phone propidium iodide (PI) and Annexin V staining Fluos.
- b. The amount of intracellular Ca²⁺ were analyzed using flowcytometry to confirm the presence of intracellular Ca²⁺ after exposure to mobile phones with Ca²⁺ probe Fluo-3 AM and propidium iodide (PI), the set percentage of intracellular Ca²⁺ (%).

3.Expression Voltage- Gated Calcium Channel (VGCC) is the expression VGCC assessment based on examination results immunocytochemistry (ICC) with the antigen-antibody reaction, there are two categories, namely the expression VGCC (+) means open calcium channels are marked with brown color in the cytoplasm or expression VGCC (-) means that calcium channels are not covered marked with brown in the cytoplasm. VGCC expression observed visually counted (calculated field of view per 100 cells).

Statistical analysis to assess differences in mean values between groups used the Kruskal-Wallis (non-parametric tests), followed by post hoc test, namely the Mann-Whitney test to determine which groups are most different. To test the strength of the relationship of expression VGCC with the quality and functionality of spermatozoa used Pearson correlation statistical tests.

III. RESULT AND DISCUSSION

Mobile phones are an essential part of every modern human life, and research is needed to evaluate the consequences of the increasing use of smartphones. This research was conducted with the aim to see the effect of exposure to mobile phone radiation on human spermatozoa quality and functionality to calculate the concentration, motility, and morphology of spermatozoa as well as counting the number of apoptotic cells and the number of intracellular Ca spermatozoa. In addition, it is also to determine whether exposure to mobile phone radiation affects the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) on spermatozoa.

1. Effect of phone exposure on the quality of spermatozoa

The quality of sperm decreases due to the effect of cell phone radiation exposure, it can be known through the mechanism of Reactive Oxygen Species (ROS). Oxidative stress induced by Reactive Oxygen Species (ROS) causing damage to spermatozoa. If ROS exceeds the antioxidant levels in the body, the excess will attack the components of the lipid, protein, and DNA causing cell damage called oxidative stress. The high ROS cause damage to spermatozoa, which ended with infertility. Spermatozoa plasma membrane containing Poly Unsaturated Fatty Acids (PUFAs) are easily damaged by ROS. Excessive ROS levels cause sperm dysfunction due to lipid peroxidation and membrane function changes that affect metabolism decrease sperm, sperm morphology, sperm motility and fertility (Hamada et al., 2011). ROS cause spermiogenesis disorders that can produce abnormal sperm morphology (Hamada et al., 2011).

1.1. Effect of cell phone exposure on the concentration of spermatozoa

The results showed that the concentration of spermatozoa tends to decrease in proportion to the increased use of cell phones is a long long time acute exposure (1 hour) and chronic exposure (2 hours) as well as the magnitude of the dose (SAR 2 W / kg and 5.7 W / kg). Decreasing the concentration of spermatozoa in exposure for 1 hour caused by the thermal energy generated from the electromagnetic wave radiation absorbed spermatozoa (Tribuana, 2006). Increased frequency causes an increase in the energy absorbed by the

spermatozoa. This is due to the temperature to be reversible adverse factors on sperm production (Jung & Schill, 2000), so it is an important target to the thermal effects of cell phone radiation exposure (Dasdag et al., 1999). In addition to thermal effects of exposure to mobile phone radiation, cell phone radiation also have radiation emissions that are circular, it caused at the time of the intervention of radiation exposure, spermatozoa move to the edge of the petri dish so that when calculating the concentration of spermatozoa as if concentrations fall. This is shown in two-hour exposure concentration of spermatozoa equally good at a dose of 2 W / kg and 5.7 W / kg.

In the in vivo situation, the process of spermatogenesis in human testis need 2° C physiological temperature lower than the optimal body temperature, testicular distance to the source of radiation, and conduction on the surface of blood flow. If the testicles are at a higher temperature (>2⁰C) will occur degeneration tubules and spermatogenesis hampered by partial or total which eventually happened infertility (Ganong, 2003). Testis is a superficial organ that absorbs more energy than any other organ. Thermal effect emitted by mobile phones on SAR <2 W / kg had no effect on the spermatozoa (Yan et al., 2007; Anderson & Rowley, 2007), but the SAR> 4 W / kg could produce 1°C rise in temperature.

1.2. Effect of cell phone exposure on sperm motility

Sperm motility is an important role in achieving a woman's ovum that the sperm motility disorders often be one of the causes of male infertility. The results showed a negative correlation between the average percentage of the number of criteria of slow progressive motility (B) with the increased use of mobile phones. As for the criteria of non-progressive motility (C) and non-motile (D) is positively correlated with the increased use of mobile phones. This is according to research de Iuliis (2009) and Erogul et al. (2006) that after exposure to mobile phone radiation decreased rapid progressive motility (A) and the slow progressive (B) of human spermatozoa and an increase in non-progressive motility (C) and non-motile (D).

Capacitation of spermatozoa that spermatozoa ability to store energy to move. Capacitation process involves two components, increase the velocity of spermatozoa and facilitate the preparation of spermatozoa undergo the acrosome reaction (Ganong, 2003). In addition mitochondria become important organelles associated with sperm motility. Mitochondria are organelles of eukaryotic cells that function as plant respiration organ by producing adenosine triphosphat energy (ATP). The number of mitochondria per cell depending on the type of cells and organisms. Mitochondria are found in large numbers in cells that have a high metabolic activity of the cells contractile like spermatozoa. The tail of the sperm is a tool that requires a high-energy movement of mitochondria that many get on the neck (Ganong, 2003).

Low sperm motility, can be a cause of male infertility situation (Jensen et al., 2011). This can be explained that exposure to mobile phone radiation produces negatively charged electric current as it passes through the cell membrane, while the body act as an antenna to absorb cell phone radiation and converts it into alternating eddy currents. Cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} binds naturally with cell membranes contain proteins negatively charged phospholipids, and disrupt the stability of the cell membrane (Goldsworthy, 2007), encourages calcium ions (Ca efflux) and damaging the cell membrane (Goldsworthy, 2007), so that Ca^{2+} depleted replaced by potassium which makes the cell membrane is weak and leaky, because potassium has a limited ability to stabilize membranes. Damage to the plasma membrane causing motility disorders that can be seen in various studies (Alavi & Cosson, 2006).

In this study, the data that the criteria of non-progressive motility (C) and non-motile (D) is positively correlated with an increase in intensity of use of mobile phones. The greater the intensity of exposure to cell phone radiation, the more spermatozoa motility disorders such as not moving progressive and did not even move at all. This is because the cell phone radiation exposure affects the plasma membrane of the sperm in the neck where there are many mitochondria are useful as a source of energy for sperm motility. When mitochondria suffered significant damage sperm motility is also impaired (Ahmad & Baig, 2011).

Exposure to cell phone radiation causes increase in ROS, which is one form of free radicals that have a very high reactivity. This is demonstrated by its immediate interest or attack of electrons that can cause the formation of new free radicals from atoms or molecules that the electron is taken. The main target of free radicals are proteins, lipoproteins, DNA elements including carbohydrates and especially unsaturated fatty acids or Poly Unsaturated Fatty Acids (PUFA) which are components in the plasma membrane of spermatozoa easily attacked by ROS. This can cause lipid peroxidation that can have an effect on the decline in the quality and functionality of spermatozoa so that is one risk factor for male infertility (Hamada et al., 2011).

In this study, the cells other than spermatozoa are leukocytes, this affects the Reactive Oxygen Species (ROS) through mechanisms of interference with the integrity of mitochondrial (the main component of phospholipid) a process of lipid peroxidation that if the fatty acid phospholipid oxidized by free radicals (oxidative stress) generates radicals smoking and increased production of ROS spermatozoa (Kesari et al., 2011) by stimulation of NADH oxidase and a reduction in the production of ATP, then an increase in the concentration of MDA and mitochondrial membrane potential will be impaired resulting in a disparity in the motility of spermatozoa in the form of a decrease in the percentage of fast progressive motility and increase the percentage of non-motile spermatozoa (Falzone et al., 2010; Ahmad & Baig, 2011; Agarwal et al., 2009; Agarwal et al., 2003). Increased ROS production will reduce the activity of Protein Kinase C (PKC). PKC is localized in the equatorial segment of the sperm and in the principal piece of the flagellum that contribute to poor sperm motility (Rotem et al., 1990). Sources of free radicals responsible for generating stress in mitochondria that causes apoptosis through pathways nitrite (Koppers et al., 2008). Excess ROS detected the presence of leukocytes (Falzone et al., 2010).

On exposure to acute, cell phone radiation causes increased lipid peroxide in the sperm membrane containing PUFA through increased production of ROS, thus stimulating the activity of the enzyme oxidase membrane NADH plasma, and reduce the production of ATP, which is characterized by an increased

concentration of MDA (Ahmad & Baig, 2011; Friedman et al., 2007; Agarwal et al., 2009). This will damage biomolecules including DNA fragmentation, enzymes, lipids, and proteins (De Iuliis et al., 2009) thus causing a decrease in the percentage of slow progressive motility criteria (C) and increased the percentage of non-motile motility criteria (D). While the cell phone radiation exposure is chronic, related to excess ROS, causing activation of heat shock protein (hsp) as a protective response. Hsp task is to join an important enzyme, forming a protective layer around the enzyme, to protect it from damage, but the activation of hsp unable to protect from all the stress, which can affect sperm metabolism. Heat shock protein (hsp) stabilizes endothelial stress fibers and alter the secretion of basic fibroblast growth factor (bFGF), resulting in increased permeability bloodbarier testes and cause infertility (Desai et al., 2009).

Based on this study, it can be said that the increased risk for oxidative stress in sperm cell phone electromagnetic radiation is real, but the burden of risk is determined by the duration of mobile phone use, frequency of cell phone radiation, SAR and distance with the male reproductive organs.

The results of this study indicate that there is a decrease in the percentage of slow progressive motility criteria (B) with the increased use of mobile phones. As for the criteria of non-progressive motility (C) non-motile (D) is positively correlated with the increased use of mobile phones due to exposure to electromagnetic radiation cell phone along with an increase in the length and intensity of exposure to mobile phone radiation. This is in accordance with our hypotheses that the longer and the greater the exposure to radiation of electromagnetic waves radiofrequency phone, the lower the quality of human spermatozoa in vitro, in this case the percentage of motility criteria spermatozoa slow progressive (B), non-progressive (C) and non -motile (D).

1.3. Effect of cell phone exposure on morphology of spermatozoa

Long time exposure (acute and chronic) and the magnitude of the dose (SAR 2 W / kg and 5.7 W / kg) effect on the average percentage of morphologically normal spermatozoa are getting longer and the greater the intensity of cell phone radiation, the mean percentage of morphologically normal

spermatozoa wane. This is consistent with the results of research Wdowiak et al., (2007), which recorded a significant increase in the percentage of abnormal sperm morphology related to duration of exposure to mobile phone radiation. In this study, sperm abnormalities caused by free radicals on cell phone radiation exposure. It can be seen between the control group and the treatment group, where a decline in the number of normal sperm morphology in the group exposed to cell phone radiation. In accordance with the opinion of Hamada et al. (2011), that the increase in morphological abnormalities can be caused by free radicals that come from cell phone radiation.

In this study, the duration of exposure (acute and chronic) as well as the magnitude of the dose (SAR 2 W / kg and 5.7 W / kg) had no effect on the average percentage of morphological abnormalities of the head. In this study, the mean percentage of abnormal morphology of the head as the control group and exposure to mobile phone radiation so that the occurrence of abnormal morphology of the head probably due to thermal effects of radiation-induced physical stress spermatozoa thereby affecting the plasma membrane of spermatozoa with consequent abnormalities morphology of the head in the form of a small head and pyriform.

The longer and the greater the intensity of cell phone radiation, the mean percentage of abnormal spermatozoa morphological abnormalities of the neck, the mean percentage of morphological abnormalities of spermatozoa tail and the mean percentage of cytoplasmic sperm morphological abnormalities increased. Exposure to cell phone radiation causes increased production of free radicals in vitro conditions. A free radical is an unstable molecule that nature so as to obtain a pair of electrons, these molecules tend to be highly reactive and corrosive to healthy cells. Excessive amount of free radicals that cause damage due to the formation of spermatozoa membrane lipid peroxide in the plasma membrane (Hamada et al., 2011). Spermatozoa plasma membrane contains phospholipids and unsaturated fatty acids in large amounts, where the unsaturated fatty acids are very vulnerable to attack by free radicals, especially hydroxyl radicals, so that ROS can easily penetrate the plasma membrane. The hydroxyl radical will cause

chain reaction called lipid peroxidation. The end result of this chain reaction is a disconnection of fatty acids into compounds that are toxic to spermatozoa (Gye & Park, 2012). This will result in abnormal sperm morphology.

While *in vivo*, this happens because of the effect of cell phone radiation exposure may affect the synthesis of the hormone testosterone through two mechanisms. The first mechanism interrupt adenyl cyclase enzyme activity in Leydig cell membranes (intra testicular), resulting in inhibition of the synthesis of testosterone. The second mechanism stimulates the adrenal medulla (in extra testicular) to release catecholamines. Catecholamines can affect the central nervous system which can impair the process of spermatogenesis and testosterone synthesis through a feedback mechanism between the anterior hypothalamus-pituitary-testes. The hormone testosterone plays a role in sperm maturation in the epididymis (Amarudin, 2012). Declining levels of testosterone cause spermiogenesis process is not running optimum lowering the quality, including morphology of spermatozoa. Therefore morphological abnormality occurs in the process of spermatogenesis is at the stage of spermiogenesis which resulted in disruption of enzyme function and mechanism of action of a hormone in the formation of spermatozoa (Hamada et al., 2011; (Otitoloju et al., 2010).

The results of microscopic observation of spermatozoa which got cell phone radiation exposure seen their sperm cells that are not normal, namely the absence of a tail or head, small head, tail folded, the tail broke in the middle, which indicates these cells degenerate. Abnormalities in sperm morphology is composed of abnormality primary and secondary abnormalities. Primary abnormality may occur due to abnormalities in the process of spermatogenesis occurs in the tubuli seminiferi, while secondary abnormalities in spermatozoa damage occurs during its passage through the epididymis, during the phase of ejaculation, or after ejaculation occurs or an error in the preparation of preparations (Amarudin, 2012).

Head of spermatozoa abnormalities occur during spermatogenesis (*in vivo*). Spermatogenesis can occur through several stages of division. The initial stage, spermatogonia transformed into primary spermatocytes, then become

secondary spermatocytes and become spermatids. Before spermatids into spermatozoa there is a phase that passed spermatid called spermiogenesis phases. This phase consists of the phases of the Golgi, cap, acrosomal and maturation aims to form a morphologically normal spermatozoa consisting of head, neck and tail. Disorders, these disorders can be caused by hormonal, free radicals and dietary supplement ingredients (Gye & Park, 2012). Free radicals cause lipid peroxidation of cell membranes and damaging the cell membrane organization. The cell membrane is very important for receptor function and the function of the enzyme, so that the occurrence of lipid peroxidation resulting in total loss of cellular function (Amarudin, 2012). Disturbances in spermatogenesis is due to the current lack of energy, this is due to exposure to cell phone radiation can alter the mechanism of action of hormones and enzymes that regulate sperm motility and morphology

At the head and tail of the sperm cell membrane connected by enabling the separation during cell movement and displacement cytoplasm. In spermatozoa abnormalities in the posterior part of the head, sometimes not formed membrane was perfect so that contact with basal tail less powerful, this is because the membrane damage spermatozoa by ROS and lipid peroxidation of unsaturated fatty acids in the head and neck spermatozoa causes morphological changes in spermatozoa (Gye & Park, 2012).

Abnormalities morphology tail of spermatozoa in the form of a tail that curled or off occurs when free radicals are formed to meet with unsaturated fatty acids in cell membranes, causing the reaction of lipid peroxidation of cell membranes, resulting in increased membrane fluidity, impaired membrane integrity and inactivation of bonding the membrane with enzymes and receptors , This will cause increased damage to sperm cells (Amarudin, 2012). If the lower mitochondrial ATP production and intracellular ATP diminishes rapidly result in damage aksonema, decreased sperm viability, morphology midpiece increasing damage, loss of the ability of sperm capacitation and the acrosome reaction and sperm movement barriers. This will increase due to low sperm tail abnormalities

of mitochondrial ATP by free radicals on cell phone radiation exposure (Ahmad & Baig, 2011; Hamada et al., 2011).

For spermatozoa had abnormal morphology neck, tail and cytoplasm was positively correlated with the increased use of mobile phones due to exposure to electromagnetic radiation cell phone along with an increase in the length and intensity of exposure to mobile phone radiation. This is in accordance with our hypotheses that the longer and the greater exposure to radiofrequency electromagnetic radiation of mobile phones, the lower the quality of human spermatozoa in vitro, in this case of the mean percentage of spermatozoa that have morphological abnormalities of the neck, tail and cytoplasm.

The use of mobile phones affect sperm quality by reducing the concentration of spermatozoa, improve immotilitas and improve spermatozoa morphological abnormalities, associated with male infertility. This is consistent with our hypotheses that the longer and the greater exposure to radiofrequency electromagnetic radiation of mobile phones, the lower the quality of human spermatozoa..

2. Effect of phone exposure on sperm functionality

Cell phone radiation causes changes in ROS, and the activity of antioxidant enzymes (Kesari et al., 2011, Kumar et al., 2011; Kumar et al, 2010). Moustafa et al. (2001) showed that there is a decrease in activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase human erythrocytes were exposed to mobile phone radiation (Oral et al., 2006; Balci et al., 2007; Ribeiro et al., 2007).

Decrease in SOD activity showed increased generation of reactive superoxide ion. Induction of cell phone radiation exposure caused oxidative stress which manifests PKC enzyme complex changes in the seminiferous tubules and Leydig. Antioxidants such as melatonin, caffeic acid, phenyl ester, vitamin C, and vitamin E to prevent oxidative stress or apoptosis caused by mobile phone radiation in various animal tissues (Oktem et al., 2006; Ozguner et al., 2006; Oral et al., 2006).

2.1.Effect of exposure mobile phone on the number of sperm cells that

undergo apoptosis

On examination of apoptosis by flowcytometry, researchers did not do centrifugation (centrifugation) by the reasons that led to low yields centrifugation motility caused damage to the integrity of the membrane. Susilawati (2011), mentions that sexing by centrifugation resulting membrane damage structurally ..

The result showed that the average percentage of spermatozoa that undergo apoptosis in the control group and the treatment group who received radiation exposure obtained significant difference ($p < 0.05$), where the average percentage of apoptotic spermatozoa was higher in the group exposed to radiation compared to the control group. This is because exposure to cell phone radiation causes changes in calcium homeostasis with consequent influence on the metabolic pathway of cellular macromolecules. Exposure to cell phone radiation induces changes in the plasma membrane potential and calcium efflux with the result that a reduction in calcium generated thus causing a decrease in the activity of protein kinase C (PKC). This decrease causes changes in the enzyme, ion pumps, channels and protein and stimulating apoptosis and changes in serum testosterone, the expression of mRNA for the first enzyme in steroidogenesis in Leydig cells (Zhou et al., 2005).

The results of the study researchers showed that there was a positive correlation between apoptosis with motility criteria of non-progressive (C) spermatozoa ($p = 0.046$; $r = 0.348$) in which a growing number of spermatozoa undergoing apoptosis, hence increasing also the number of spermatozoa have motility criteria of non-progressive (C). This is consistent with research Paasch et al. (2004) and Marchetti et al. (2004a) that the apoptotic cascade signal component correlated with sperm motility and morphology of spermatozoa (Aziz et al., 2007) as well as the ability of human spermatozoa fertilization (Said et al., 2006; Grunewald et al., 2007). Research Aziz et al. (2007) showed that during apoptosis, abnormalities in sperm tails occur due to positive annex makes tail movement becomes difficult. Results of research Sakkas et al. (1999) also showed that individuals with higher levels of apoptosis have an increased percentage of sperm with genetic damage and quantity of sperm immotil higher anyway.

2.2. Effect of cell phone exposure on the number of spermatozoa in intracellular Calcium

The result showed a significant difference in the control group with exposure to 2 W / kg for 1 hour ($p < 0.05$), whereas the exposure of 2 hours there was no significant difference ($p > 0.05$), also occurred in the exposure group 5.7 W / kg. This shows that the exposure for 1 hour can affect the average percentage of spermatozoa both intracellular calcium at a dose of 2 W / kg and a dose of 5.7 W / kg. While the control group who were given verapamil, thapsigargin, and progesterone affect the average percentage of the amount of intracellular calcium spermatozoa after exposure for 2 hours.

The average percentage of spermatozoa in intracellular calcium in vitro conditions occur the downward trend in the amount of calcium approaching the average percentage of spermatozoa intracellular calcium control group in the group receiving cell phone radiation exposure 2 W / kg and 5.7 W / kg, group verapamil and thapsigargin, except progesterone group that an increase in the average percentage of spermatozoa intracellular calcium compared to the control group. The results of this study indicate that the closures of calcium channels in the group exposed to cell phone radiation, thapsigargin group and verapamil group so that the amount of intracellular calcium spermatozoa in the group is reduced.

In the group of progesterone increase the amount of intracellular calcium due to the nature of progesterone which opens calcium channels so that calcium from outside the cell to enter the cell. Calcium ions as the most important intracellular messenger in regulating sperm motility mediated by Ca^{2+} channels, can reduce the activity of sperm.

3. Effect of exposure mobile phone radiation on the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) spermatozoa

Calcium is one of the secondary messenger molecule. Protein kinase C (PKC) is one of the lines associated with secondary messenger and is a family of

enzymes involved in controlling the pumping function of other proteins and channels through phosphorylation of hydroxyl groups of serine and threonine amino acid residue protein (Larsson, 2008). PKC enzymes are activated by signals such as increased concentrations of diacylglycerol or Ca^{2+} . Therefore, the enzyme PKC plays an important role in several signal transduction cascade as mediating cellular responses to extracellular stimuli in proliferation, differentiation, apoptosis, and exocytotic expenditure in a number of non-neural cells and sperm cells (Naor & Breitbart, 1997).

The results showed that in the group exposed to cell phone radiation, and a group of verapamil have expression VGCC few in number then this indicates that the exposure to radiation of electromagnetic waves of radiofrequency phones can decrease the expression of VGCC so it can be said that exposure to mobile phone radiation cause expressions VGCC / calcium channels close for results research on the intervention group receiving verapamil verapamil which serves as a calcium channel blocker.

The results are consistent with the hypothesis that progesterone administration to significantly improve the quality of sperm parameters as well as gene expression CatSper, so there is a difference of expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) spermatozoa that got the intervention of exposure to mobile phone radiation, verapamil, thapsigargin, and progesterone, which the radiation exposure phone radiofrequency electromagnetic waves decreased the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) human spermatozoa.

There is a correlation between the expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) on spermatozoa with sperm quality (cell concentration $p = 0.003$; $r = 0.361$; $p = 0.000$ B motility; $r = 0.664$; motility D $p = 0.000$, $r = -0.660$; normal morphology $p = 0.000$; $r = 0.634$; morphological abnormalities tailed $p = 0.008$, $r = -0.324$) and the functionality of spermatozoa (apoptosis $p = 0.039$; $r = 0.257$) after exposure to radiofrequency electromagnetic radiation of mobile phones. This means that more and more the expression VGCC in can mean more calcium channels that are open, so the better the quality (concentration, morphology, motility) and functionality (apoptosis, intracellular Ca)

spermatozoanya. This is because the expression VGCC (CatSper) is the first calcium ion channels associated with motility and hyperactivation. CatSper deficiency as at the time of verapamil and due to exposure to cell phone radiation is closing calcium channels lead to infertility as a result of disturbances in motility and inability to fertilize the whole oocyt (Hong-Gang et al., 2006).

IV. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

1. Conclusion

The conclusions of this study are:

- 1.1. Exposure to radiofrequency electromagnetic radiation of mobile phones, lowered the quality (concentration, motility, morphology) and functionality (apoptosis, the amount of intracellular calcium) of human spermatozoa in vitro,
- 1.2. The longer and the large exposure of radiofrequency electromagnetic wave radiation phone, the lower the quality and functionality of human spermatozoa in vitro,
- 1.3. Exposure to radiofrequency electromagnetic wave radiation inhibits cell phone Expression of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) on spermatozoa in the form of calcium channel closure.

2. Recommendations

- 2.1. For the development needs to be done further research on the effects of mobile phone radiation exposure are reversible / irreversible, as a preventive measure to prevent further impacts of the use of mobile phones on health.
- 2.2. For the development need further research, especially in the field of clinical multicenter involve and lead to regulation of fertility as antifertilitas of the impact of exposure to radiofrequency electromagnetic radiation of mobile phones.
- 2.3. For the safety of mobile phone use, the mobile industry needs to produce the type of phone that has a low SAR value.
- 2.4. For the purposes of the public as consumers, need the government,

especially the Ministry of Health could consider in the decision making related to the impact of electromagnetic radiation waves by issuing regulations to reduce the risks associated with mobile phone use.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi U.F.,2011. *Dasar-dasar Penyakit Berbasis Lingkungan*. Rajawali Press. Divisi Buku Perguruan Tinggi PT. Raja Grafindo Persada.Jakarta.
- Afaf, D., Abdel-Mageid, Omnia, M., Abdel-Hamid, Olla, Talkhan, F.A. &Abeer, A.A. 2009. Biochemical and hematological effects of electromagnetic field on male rats. *EJBMB*23(5): 369-77.
- Agarwal A., Desai N.R., Makker K., Varghese A., Mouradi R., Sabanegh E., &Sharma R. 2009. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an *in vitro* pilot study. *Fertil Steril* 92(4):1318-25.
- Agarwal A., Saleh R.A. &Bedaiwy M.A. 2003. Role of reactive oxygen species in the Pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79 (4): 829-43.
- Agarwal A.& Said T.M., 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach, *BJU Internat* 95:503-507
- Agarwal, A., &Hamada, A. 2012. Unexplained Male infertility : Diagnosis and Management. *Int Braz J Urol* 38 (5). Retrieved from http://www.brazjurol.com.br/september-october-2012/Hamada_576_594.pdf.
- Agarwal, A., Deepinder, F., & Sharma, R.K. 2007. Effect of cell phone, usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *JFertilSteril* 59: 329-43.
- Agarwal, A., Aspinder S., Alla, H.& Kavindra, K. 2011. Cell phones and Male infertility : A review of recent innovations in technology and consequences. *Int Braz J Urol* vol 37 (4) : 432-454, July-August.
- Ahmad L. &Baig N.M.,2011. Mobile phone RF-EMF Exposure to Human Spermatozoa : An *in vitro* Study. *Pakistan J. Zool* 43 (6), 1147-1154.
- Alavi S.M.& Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes. (II)Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol Int* 30: 1-14
- Almeida, C., Cardoso, M.F.,Sousa, M., Viana, P., Gocalves, A., Sliva, J. *et al* 2005. Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swio-up preparation in relation to sperm quality. *Hum Reprod* 20, 1307-13.
- Anderson V &Rowley J. 2007. Measurements of skin surface temperature during mobile phone use. *Bioelectromagnetics* 28: 159-62.
- Anzar M., He L., Buhr M.M., Kroetsch T.G. &Paul K.P. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 66: 354–60.
- Amarudin, 2012. Pengaruh Merokok terhadap Kualitas Sperma pada Pria dengan Masalah Infertil Studi Kasus Kontrol di Jakarta Tahun 2011.*Thesis*. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia Depok.
- Asmarinah, 2010. Peran molekul kanal ion pada fungsi spermatozoa. *Maj Kedokt Indon* 60(8), Agustus.

- Atasoy, A., Sevim, Y., Kaya, Yilmaz, M., Durmus, A., Sonmez, M., *et al.* 2009. The effect of electromagnetic fields on peripheral blood mononuclear cell in vitro. *Britis Lek List* 110 (9): 526-9.
- Aziz N., Said T., Paasch U. & Agarwal A. 2007. The relationship between human the sperm deformity index. *Hum Repro* 22:1413-9.
- Bajpai, M. & Doncel, G.F. 2003. Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reprod* 126, 183-195
- Baker, M.A., Hetherington, L., Ecroyd, S.D., Roman, R.J., & Aitken. 2004. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci* 117, 211-222
- Balci M., Devrim E. & Durak I. 2007. Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats. *Curr Eye Res* 32: 21-5.
- Baldi E., Luconi M., Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Forti G. 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol* 308:39-46.
- Barroso, G., Morshedi, M. & Oehninger, S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 1338-44.
- Blackmore, P.F., 1993. Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium* 14:53-60.
- Baste V., Riise T. & Moen B.E. 2008. Radiofrequency electromagnetic fields; male infertility and sex ratio of offspring. *Eur J Epidemiol* 23(5):369-77.
- Buffone, M.G., Calamera, J.C., Verstraeten, S.V. & Doncel, G.F. 2005. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reprod* 129, 697-705
- Carlson A.E., Burnett L.A., del Camino D., Quill T.A., Hille B., Chong J.A., Moran M.M., Babcock D.F. 2009. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS One* 4:e6844.
- Castellano, L.E., Trevino, D., Rodriguez, C.J., Serrano, J., Pacheco, V., Tsutsumi, R., *et al.* 2003. Transient Receptor Potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization, and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett* 541, 69-74.
- Cayli S., Sakkas D., Vigue L., Demir R. & Huszar G. 2004. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 10: 365-72.
- Ceruti S., Beltrami E., Matarrese P., Mazzola A., Cattabeni F., Malorni W., *et al.* 2003. A key role for caspase-2 and caspase-3 in the apoptosis induced by 2-chloro-2'-deoxyadenosine (cladribine) and 2-chloro-adenosine in human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol* 63: 1437-47.

- Chen Z., Hauser R., Trbovich A.M., Shifren J.L., Dorer D.J. & Godfrey-Bailey L. 2006. Relationship Between Human Semen Characteristics and Sperm Apoptosis : A Pilot Study, *J Androl* 27:1: 112-120.
- Cheng C. 2005. Shear stress affect the intracellular distribution of eNOS : direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood* 26 :3691-3698.
- Colin A., Barroso G., Gómez-López N., Duran E.H., & Oehninger S. 2010. The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril* 94:2609-14.
- Dahlan, S. 2009. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat*. Edisi 4. Penerbit Salemba Medika.
- Dasdag S., Ketani M.A., Akdag Z., Ersay A.R., Sari I., Demirtas O.C., *et al.* 1999. Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. *Urol Res* 27: 219-23.
- Davoudi M., Brossner C. & Kuber W. 2002. The influence of electromagnetic waves on sperm motility. *Urol Urogynacol* 19(22):342-51.
- De Iuliis G.N., Newey R.J., King B.V., & Aitken R.J. 2009. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One* 4: e6446. 21.
- dePomerai, D., Danniels, C., David, Allan, J., Duce, I., Mutwakil, M., *et al.* 2000. Non-Thermal heat-shock response to microwave. *Nature* 405:417-418.
- Desai N.R., Kesari K.K. & Agarwal A. 2009. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 7 : 114-123.
- Deshpande, S.S., Angkeow, P., Huang, J., Ozaki, M., & Irani, K. 2000. Rac1 Inhibits TNF- α -Induced Endothelial Cell Apoptosis: Dual Regulation by Reactive Oxygen Species. *FASEB J* 14 : 1705-1714
- Di Zhang & Murali, G. 2005. Sperm Ion Channels: Review Molecular Targets for The Next Generation of Contraceptive Medicines? *J Androl* 26 (6).
- Dufau, M.L., Tinajero, J.C. & Fabbri, A. 1993. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J* 1993 Feb 1;7(2):299-307
- EduMed, 2010. *Non-Ionizing Electromagnetic Radiation in the Radiofrequency Spectrum and its effects on Human Health*. Intituto EduMed.
- El-Melegy N.T. & Ali M.E. 2011. Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol* 37:495-506.
- Elisabetta B. Michaela L. Csilla K. & Gianni F. 2011. Progesterone and spermatozoa: a long-lasting liaison comes to definition. *Hum Reprod* Advance Access published September 7, 2011 Vol.0, No.0 pp. 1–2.
- Erogul, O., Oztas, E., Yildirim, I. *et al.* 2006. Effects of electromagnetic radiation. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15,830-0.
- Esposito G., B. S. Jaiswal, F. Xie *et al.*, 2004. Ice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 9, pp. 2993–2998, 2004.

- Falzone N., Huyser C., Franken D.R. & Leszczynski D. 2010. Mobile phone radiation does not induce pro-apoptosis effects in human spermatozoa. *Radiat Res* 174: 169-76.
- Fang H.H., Zeng G.Y., Nie Q., *et al.*, 2010. Effects on structure and secretion of pituitary gland in rats after electromagnetic pulse exposure. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 90 : 3231-4.
- Fejes I., Závaczki Z., Szöllosi J., Koloszá S., Daru J., Kovács L., *et al.* 2005. Is there a relationship between cell phone use and semen quality? *Arch Androl* 51: 385-93.
- Feyyaz, Ozdemir & Aysegul, K. 2011. *Electromagnetic Waves and Human Health* 22 : 473-479. The Edumed Institute for Education in Medicine and Health Independent Research Group on the Impacts of Mobile Technologies on Health
- Ficarro S., O., Chertihin, V.A., Westbrook, F. White, F. Jayes, P. Kalab, J.A. *et al.* 2003. Phosphoproteome analysis of capacitated human spermatozoa. *J Biol Chem* 278, 11579-11589.
- Florman H.M., 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Developmental Biology* 165 (1) : 152–164.
- Foresta, C. & Rossato, M., 1997. Calcium influx pathways in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* vol 3, no. 1, pp. 1-4.
- Frank, E. G., & Jerome, J.P. 1980. *Introduction to Environmental Toxicology*. free-radical processes in rat liver and kidney. *Electro Biol and Med* 19 (1) : 99-105.
- Friedman J., Kraus S., Hauptman Y., Schiff Y., & Seger R. 2007. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. *Biochem J* 405: 559-68.
- Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caponecchia L., Familiari G., Verlengia C., Dondero F. & Lenzi A. 2000. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15: 830–839.
- Ganong W.F. 2003. Gonad : perkembangan dan fungsi sistem reproduksi. Dalam : *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 20. Jakarta : EGC, h. 408-416.
- Goldsworthy A. 2007. *The Biological Effects of Weak Electromagnetic Fields*. [cited 2011 Feb 11]. Available from: Web site: http://www.hese-project.org/hese-uk/en/papers/goldsworthy_bio_weak_em_07.pdf
- Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C.V., Barratt, C.L.R. & Publicover, S.J. 2006. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized toolkit of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 12 (3) : 253–267.
- Grunewald S., Said T.M., Paasch U., Glander H.J. & Agarwal A. 2007. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 15 (2) : 341-46.
- Gunther, W., Donner, F., Babcock, & Bertil, H. 2003. Calcium Clearance Mechanisms of Mouse Sperm. *J Gen Physiol* July 122(1): 115–128. Guyton, A.C, & Hall, J.E., 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania, pp 522-524.

- Gye M.C. & Park C.J., 2012. Effect of Electromagnetic Field Exposure on the Reproductive System. *Clin Exp Reprod Med* 39 (1): 1-9.
- Hadi R.S. 2011. Apoptosis Pada Sperma Sebagai Petanda Adanya Gangguan Kesuburan Pria. *Majalah Kesehatan PharmaMedika* 3 (2).
- Hamada A.J., Singh A., & Agarwal A. 2011. Cell Phone and their Impact on Male Fertility : Fact or Fiction. *The Open Reproductive Science Journal* 5 : 125-137.
- Hess K.C., B.H. Jones, B. Marquez et al., 2005. The soluble adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell* 9 (2) : 249–259.
- Ho H.C. & Suarez, S.S. 2001. An inositol 1,4,5-triphosphatase receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod* 65 : 1606-1615.
- Hong C.Y., Chiang B.N., & Turner P. 1984. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet* 2: 1449-51.
- Hong-Gang Li, Ai-Hua L., Xiao-Fang D., Hui Z., & Cheng-Liang X. 2006. The expression and significance of CATSPER1 in human testis and ejaculated spermatozoa. *Asian J Androl* 8 (3): 301–306.
- Ignoz, G.G. & Suarez, P. 2005. calcium/calmodulin and calmodulin kinase II Stimulate Hyperactivation in Demembrated bovine sperm. *Biol Reprod* 73 : 519-526.
- Jaiswal B.S., and Eisenbach M., 2002. Capacitation San Diego: Academic Press; pp. 57-117.
- Jensen M.B., Bjerrum P.J., Jessen T.E., Nielsen J.E., & Joensen U.N. 2011. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum Reprod* 26 (6): 1307-17.
- Jung A. & Schill W.B. 2000. Male infertility. Current life style could be responsible for infertility. *MMW Fortschr Med* 42: 31-3.
- Kavindra, Kumar, K. & Sanjay, K. 2011. Effects of Radiofrequency Electromagnetic Wave Exposure from Cellular Phones on the Reproductive Pattern in Male Wistar Rats. *Appl Biochem Biotechnol* 164 : 546-559.
- Kesari K.K., Kumar S., & Behari J. 2011. Effects of Radiofrequency Electromagnetic Wave Exposure from Cellular Phones on the Reproductive Pattern in Male Wistar Rats. *Appl Biochem Biotechnol* 15.
- Kesari K.K., Kumar S. & Behari J. 2010. Mobile phone usage and male infertility in Wistar rats. *Indian J Exp Biol* 48: 987-92.
- Kramer, P.H. 2000. CD95's Deadly Mission in the Immune System. *Nature* 407:789-795.
- Kumar S., Kesari K.K., & Behari J. 2010. Evaluation of genotoxic effects in male Wistar rats following microwave exposure. *Indian J Exp Biol* 48: 586-92.
- Kumar S., Kesari K.K., & Behari J. 2011. Influence of microwave exposure on fertility of male rats. *Fertil Steril* 95: 1500-2.

- Larsson C. 2008. New insights into PKC family affairs:three novel phosphorylation sites in PKCepsilon and at least one is regulated by PKCalpha. *Biochem J* 411: 15-6.
- Leblond, C.P. & Clermont, Y. 1972. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian J Androl* 6: 29-34.
- Leszczynski, D., Joenvaara, S., Reivinen, J. & Kuokka, R., 2002. Non-thermal: Mechanism of spontaneous inside-out vesiculation of red cell membranes. *J Cell Biol* 106: 1893-901.
- Liu D.Y., Clarke G.N., Martic M., Garret C., & Baker H.W. 2001. Frequency of disordered zona pellucida (ZP) –induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding. *Hum Reprod* 16 :1185-11190.
- Lishko P.V., Botchkina I.L. & Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471:387-391.
- Luconi, M. & Baldi, E. 1996. How do sperm swim ? molecular mechanisms underlying sperm motility : *Cell Mol Biol* 49 : 357-369.
- Maneesh, M., Anil, P.K., Jayalekshmi, H., Bargav, K., & Rohith, V. 2009. Radiofrequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8 GJZ) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. *Clinics* 64(6) : 561-5.
- Marchetti C., Gallego M.A., Defosse A., Formstecher P. & Marchetti P. 2004a. Staining of human sperm with fluorochromelabeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum Reprod* 19: 1127–34.
- Marchetti C., Obert G., Deffosse A., Formstecher P. & Marchetti P. 2004b; Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17: 1257–65.
- Marin, Briggiler, C.I., Jha O., Chertihin, M.G., Buffone, J.C., Herr, M.H., Vasquez, Levin, P.E., & Visconti. 2005. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci* 118 : 2013-2022.
- Mannowetz N., N. M. Naidoo, S.-A. Choo, J. F. Smith, and P.V. Lishko. 2013. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *eLife*, vol. 2, Article ID e01009, 2013.
- Meizel, S. & Turner, K.O., 1993. Initiation of the human acrosome reaction by thapsigargin, *J Exp Zool* 267 : 350-355.
- Meizel S., Turner K.O., Nuccitelli R. 1997. Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 182:67-75.
- Milani, M., Balerini, M., Ferraro, I., Zabeo, M., Barberis, M., Cannona, M. & Faleri, M., 2001. Magnetic fields effects on human lymphocytes. Electromagnetic field effect on human lymphocytes. *Electro Biol and Med* 20 (1) : 82-106.

- Mohammadi, S., Jalali, M., Nikraves, M.R., Gholamin, M., Fazel A., Ebrahimzadeh, A., & Sankian, M. 2013. Effects of L- carnitine treatment on expression of CatSper proteins in the aging mouse model. *European Journal of Experimental Biology* 3 (3) : 731-735
- Morelli, A., Ravera, S. Panfoli, I. & Pepe, I.M. 2005. Effects of extremely low motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. *Theriogenology* 61: 1487-1498.
- Mouradi RD, Nisarg; Erdemir, Ahmet; Agarwal, & Ashok. 2011. *The Use of FDTD in establishing In-vitro experimentation conditions representative of lifelike cell phone radiation on the spermatozoa*. (Unpublished observation).
- Moustafa Y.M., Moustafa R.M., Belacy A., Abou-E.E.S.H., & Ali F.M. 2001. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidant activities in human erythrocytes. *J Pharm Biomed Anal* 26: 605-8.
- Mycek, Mary, J., Richard, A., Havey, Pamela, C., Champe, Bruce, D., & Fisher. 2001. *Farmakologi*. Ulasan Bergambar Edisi 2. Alih Bahasa : Azwar Agoes. Widya Medika, Jakarta : 274-275.
- Naor Z., & Breitbart H. 1997. Protein kinase C and mammalian spermatozoa acrosome reaction. *Trends Endocrinol Metab* 8: 337-42.
- Nieschlag, E., & Behre, H.M. 1990. *Testosterone Action Deficiency Substitution*. Berlin London. Tokyo. New York.
- Nordøy A., Bønå K.H., Nilsen H., Berge R.K., Hansen J.B., Ingebretsen O.C. 1998. Effects of Simvastatin and omega-3 fatty acids on plasma lipoproteins and lipid peroxidation in patients with combined hyperlipidaemia. *J Intern Med* 243 (2): 163-70
- Nylund R., Leszczynski D., Joenväärä S., & Reivinen J. 2004. Applicability of discovery science approach to determine biological effects of mobile phone radiation. *Proteomics* 4: 426-31.
- Oehninger S., Morshedi M., Weng S.L., Taylor S., Duran H., & Beebe S. 2003. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 7: 469-76.
- Oehninger S, Sueldo C, Lanzendorf S, Mahony M, Burkman LJ, Alexander NJ, Hodgen GD. 1994. A sequential analysis of the effect of progesterone on specific sperm functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. *Hum Reprod* 9:1322-1327.
- Oktem F., Ozguner F., Mollaoglu H., Koyu A., & Uz E. 2006. Oxidative damage in the kidney induced by semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *J. Fertility and Sterility* 6 : 221-29.
- Oral B., Guney M., Ozguner F., Karahan N., Mungan T., Comlekci S., et al. 2006. Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C. *Adv Ther* 23: 957-73.

- Otitolaju A.A., Obe I.A., Adewale O.A., Otubanjo O.A., & Osunkalu V.O., 2010. Preliminary Study on the Induction of Sperm Head Abnormalities in Mice, *Mus musculus*, Exposed to Radiofrequency Radiations from Global System for Mobile Communication Base Stations. *Bull Environ Contam Toxicol* 84:51–54. DOI 10.1007/s00128-009-9894-2.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. 2000. Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 11:1571-1584
- Ozguner F., Bardak Y., & Comlekci S. 2006. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: a comparative study. *Mol Cell Biochem* 282: 83-8.
- Paul S.P. 2011. *Komunikasi Sel dalam Biologi Molekular. Jalur Sinyal dan Implikasi Klinis*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Paasch U., Grunewald S., Dathe S., & Glander H.J. 2004. Mitochondria of human Spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1030: 403–9.
- Paksy, K., Thuroczy, G., Forgacs, Z., Lazar, P. & Gaati, I., 2000. Influence of sinusoidal 50-Hz magnetic field on cultured human ovarian granulosa cells *Electro Biol and Med J* 19 (1) : 95-99.
- Pentikäinen V., 2002. Regulation of male germ cell apoptosis : Roles of sex steroids and the cellular death receptors Fas and TNFR1. *Dissertation*. Programme for Developmental and Reproductive Biology Biomedicum, Helsinki University of Helsinki, Finlanda.
- Pommier Y., Sordet O., Antony S., Hayward R.L., & Kohn K.W. 2004. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23: 2934-49.
- Qadrijati, I. 2002. Kuantitas dan Kualitas Sel Darah Putih Manusia yang Bermukim di Bawah SUTET. *Thesis*. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Qadrijati I. & Farah R., 2007. Pengaruh Paparan Radiasi Gelombang Elektromagnetik Frekuensi Ekstrem Rendah Terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Mencit (*Mus Musculus*). *Penelitian DIPA FK UNS*. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Qadrijati, I. & Veronika, D. 2007. Pengaruh Paparan Radiasi Gelombang Elektromagnetik Frekuensi Ekstrem Rendah Terhadap Sel Darah Putih Mencit (*Mus Musculus*). *Penelitian DIPA FK UNS*. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Rahman S., Kwon W.S., and Pang M.G. 2014. Calcium Influx and Male Fertility in the Context of the Sperm Proteome: An Update. *Review Article. BioMed Research Int* ID 841615, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/841615>
- Reed J.C. 2000. Mechanisms of Apoptosis, *Am J Pathol* 157 : 1415-1430.
- Ren D. & Xia J. 2010. Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization. *Physiology* 25 (3): 165-175 (DOI: 10.1152/physiol.00049.2009)

- Ribeiro E.P., Rhoden E.L., Horn M.M., Rhoden C., Lima L.P., & Toniolo L. 2007. Effects of subchronic exposure to radio frequency from a conventional cellular telephone on testicular function in adult rats. *J Urol* 177: 395-9.
- Ricci, G., Perticarari, S., Fragona, E., Giolo, E. S., Canova, C., Pozzobon, S., Guaschino & Presani, G. 2002. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod* 17(10): 2665-2672.
- Robert, F., Cleveland, Jerry, L. & Ulcek. 1999. *Questions and Answers about Biological Effects and Potential Hazard of Radiofrequency Electromagnetic Fields*. Oet Bulletin 56, Fourth edition, Washington DC.
- Riedl SJ & Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
- Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, Kalina M, & Naor Z (b) 1990. Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7305-8.
- Said T., Agarwal A., Grunewald S., Rasch M., Baumann T., Kriegel C., *et al.* 2006. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an *in vitro* model. *Biol Reprod* 74: 530-7.
- Said T.M., Gaglani A., & Agarwal A. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online* 21:456-62.
- Said T.M., Paasch U., & Glander H.J. 2004. Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod* 10: 39 -51.
- Sakkas D., Mariethoz E., & St. John J.C. 1999. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251: 350 -355
- Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G.C., Mariethoz E., Tarozzi N. & Bizzaro D. 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66:1061-1067.
- Salama N., Kishimoto T., Kanayama H.O. & Kagawa S. 2009. The mobile phone decreases fructose but not citrate in rabbit semen: a longitudinal study. *Syst Biol Reprod Med* 55: 181-7.
- Schuffner A.A., Bastiaan H.S., Duran H.E., Lin Z.Y, Morshedi M., Franken D.R & Oehninger S. 2002. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol Hum Reprod* 8:722-727.
- Schuh, K., Cartwright, E.J. , Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J.C. *et al.* 2004. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem* 279: 28220-28226.
- Shaha, C., 2007. Modulators of spermatogenic cell survival. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63:173-86.
- Sharoare H., Johannisson A., Wallgren M., Nagy S., Siqueira A.P., & Rodriguez-Martinez H. 2011. Flowcytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art., *Asian Journal of Andrology* 13(3): 406-419.

- Shukla K.K., Mahdi A.A., & Rajender S. 2012. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:746-54.
- Shun L.W., Steven, L., Taylor, Mahmood, M., Alessandro, S., Hakan, D.E., Stephen, B., & Sergio, O. 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 8 (10) : 984-991.
- Shunyang H., Keeran K.J. & Woods L.C., 2004. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. *Theriogenology* 61:1487-1498.
- Siddighi S., Patton W.C., Jacobson J.D., King A., & Chan P.J. 2004. Correlation of sperm parameters with apoptosis assessed by dual fluorescence DNA integrity assay. *Arch Androl* 50:311-314.
- Smith J.F., Syrityna O., Fellous M., Serres C., Mannowetz N., Kirichok Y. & Lishko P.V. 2013. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:6823-6828
- Soeradi, O. 1990. Protein Pengikat Androgen dan Spermatogenesis. *Majalah Kedok Indon*, 28: 62-66
- Sonja G., Manja R., Martin R., Thomas B., Uwe P. & Hans J.G.. 2008. Stability of fluorochrome based assays to measure subcellular sperm functions. *Asian J Androl* 2008; 10 (3): 455-459
- Spierings D., McStay G., Saleh M., Bender C., Chipuk J., Maurer U., *et al.* 2005. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 310: 66-7.
- Stefan S. & Florian L. 2013. *Color Atlas of Pathophysiology*. Rudigerstrabe 14, Stuttgart, Germany.
- Strunker T., Goodwin N., Brenker C., Kashikar N.D., Weyand I., Seifert R. & Kaupp U.B. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 471:382-386
- Sumigama S., Mansell S., Miller M., Lishko P.V., Cherr G.N., Meyers S.A., and Tollner T. 2015. Progesterone accelerates the completion of sperm capacitation and activates CatSper channel in spermatozoa from the rhesus macaque. BOR Papers in Press. Published on October 21, 2015 as DOI:10.1095/biolreprod.115.129783
- Susilowati, S. 2011. Effect of Centrifugation of Goat Semen to Free Radical Concentrate on Washing Medium. *Media Veterinaria Medika* 4 (2).
- Tahmineh, P., Gholamhossein, F., Jafar, S.R., & Marefat, G.N. 2007. Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian J Reprod Med* 5 (3) :117-120.
- Takashi, K., Kaneko, I., Date, M., & Fukada, E., 1986. Effect of pulsing electromagnetic fields on DNA synthesis in mammalian cells in culture. *Cell and Mol Life Sci* 42 (2) : 185-186.
- Tauhid, N.A., 2008. *Dasar-dasar Biologi Molekuler. Menelusuri Jejak Hayati dari Asam Nucleat ke Protein dan Keajaiban Bioteknologi*. Bandung : Widya Padjadjaran.

- Tian, F., Lisi, A., Yoshida, M., Honda, N., Hirose, H., & Miyakoshi, J. 2002. Exposure to power frequency magnetic fields suppresses X-ray-induced apoptosis transiently in Ku80-deficient xrs5 cells. *Biochem and Biophysical Research Comm* 292 (2) : 355-361.
- Timothy, A.Q., Dejian, R., David, E.C., & David L.G., 2001. A Voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *PNAS* 98 (22): 12527-12531.
- Tinajero, J.C., Fabbri, A., & Dufau, M.L. 1992. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. *Endocrinology* Apr;130(4):1780-8.
- Tjay, T. H. & Kirana, R. 2002. *Obat-obat Penting*. Edisi ke 5. PT Alex Media
- Tollner T.L., Vandevoort C.A, Yudin A.I., Treece C.A, Overstreet J.W., Cherr G.N..2009. Release of DEFB126 from macaque sperm and completion of capacitation are triggered by conditions that simulate periovulatory oviductal fluid. *Mol Reprod* 76:431-443.
- Tribuana N., 2006. *Pengukuran medan listrik dan medan magnet di bawah SUTET 500kV*. <http://www.elektroindonesia.com/elektro/ener32a.html>, 2000.
- Uhler M.L., Leung A., Chan S.Y., Wang C. 1992. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril* 58:1191-1198
- Umar, F.A. 2011. *Dasar-Dasar Penyakit Berbasis Lingkungan*. Gramedia.
- Wang, B. & Lai, H. 2000. Acute exposure to pulsed 2450-MHz microwave affect water-maze performance in rats. *Bioelectromagnetics* 21 : 52-56.
- Wdowiak A., Wdowiak L., & Wiktor H. 2007. Evaluation of the effect of using mobile phones on male fertility. *Ann Agric Environ Med* 14(1):169-172.
- Wennemuth G., D. F. Babcock, & B.Hille.2003. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm, *The Journal of General Physiology*, 122 (1): 115–128.
- WHO. 1999. *Laboratory biosafety manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed. Geneva, World Health Organization.
- Williams, K.M. & Ford, W.C. 2001. The motility of demembrated human spermatozoa is inhibited by free calcium ion activities of 500 nmol/L or more. *Int J Androl* 24 : 216-224.
- Willingham, M.C. 1999. Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis. *J.H.C.* 47 : 1101-1110
- Wlodkowic D., Skommer J., & Darzynkiewicz Z. 2012. Cytometry of apoptosis . Historical perspective and new advance. *Experimental Oncology* 34 : 255–262, (September)
- Wolf, F.I., Torsello, A., Tedesco, B., Fasanella, S., Boninsegna, A., D'Ascenzo, M., *et al.* 2005. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta* Mar.22; 1743 (1-2);120-9. <http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n6/images/nrc821-i1.gif>

- Xia J. and D. Ren. 2009. The BSA-induced Ca^{2+} influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 119.
- Yan J.G., Agresti M., Bruce T., Yan Y.H., Granlund A., & Matloub H.S. 2007. Effects of cellular phone emissions on sperm motility in rats. *Fertil Steril* 88: 957-64.
- Yoshimura, S., Banno, Y., Nakashima, S., Takenaka, K., Sakai, H., Nishimura, Y., et.al. 1998. Ceramid Formation Leads to Caspase 3 Activation During Hypoxic PC12 Cell Death. Inhibitory Effect of Bcl-2 on Ceramid Formation and Caspase-3 Activation. *J Biol Chem* 273: 6921-6927.
- Zhou W., Wang X.B., Yang J.Q., Liu Y., & Zhang G.B. 2005. Influence of electromagnetic irradiation on P450scc mRNA expression in rat testis tissues and protective effect of the shield. *Zhonghua Nan Ke Xue* 11: 269-71.
- Zorn B., Ihan A., Kopitar A.N., Kolbezen M., Sesek B.A., & Meden V.H. 2010. Changes in sperm apoptotic markers as related to seminal leukocytes and elastase. *Reprod Biomed Online* 21:84-92.
- Zyrmec A., Jerman, I., & Lahajnar, G., 2002. Alternating electric fields stimulate ATP synthesis in *Escherichia Coli*. *Cell and Mol Biol Letters* 7 (1), 172-175.

LAMPIRAN

CURRICULUM VITAE PROMOVENDA

IDENTITAS

Nama lengkap dan derajat akademik	: dr. Isna Qadrijati, MKes
NIP	: 196701301996032001
Tempat dan tanggal lahir	: Surakarta, 30 Januari 1967
Agama	: Islam
Pangkat dan Gol. ruang	: Pembina / IV a
Jabatan	: Lektor Kepala
Alamat Rumah	: Jl. Puntodewo 32, Cemani, Grogol, Sukoharjo
Alamat Kantor	: Lab. Fisiologi Fakultas Kedokteran UNS Jl. Ir. Sutami 36 A Ketingan, Jebres, Surakarta 57126
Telp	: (0271) 724159 /08122613360
E-mail	: qadrijati@gmail.com
Status Perkawinan	: Menikah, anak 2
Nama Suami	: Drs. Hardjono, MSi.
Nama Anak	: 1. Afina Naharindya Vidyanindita (22 tahun) 2. Nurindria Naharista Vidyapramatya (17 tahun)

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. Sekolah Dasar : SD Muhammadiyah 1 Surakarta, Lulus Tahun 1979
2. Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama : SMP Negeri 5 Surakarta, Lulus tahun 1982
3. Sekolah Lanjutan Tingkat Atas : SMA Negeri 1 Surakarta, Lulus tahun 1985
4. S1 Program Studi Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Lulus 1992.
5. S2 Program Studi Ilmu Kesehatan Kerja, Minat utama Kesehatan Lingkungan, Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Lulus tahun 2002.

RIWAYAT PEKERJAAN

1. Tahun 1992-1993, Dokter Jaga RS. PKU Muhammadiyah Surakarta.
2. Tahun 1993-1996, Dokter PTT Puskesmas Kota Mungkid, Kabupaten Magelang.

3. Tahun 1996 –sekarang, Staf pengajar di Fakultas Kedokteran UNS Surakarta.

PENGALAMAN PENELITIAN

1. Kuantitas dan kualitas sel darah putih manusia yang bermukim di bawah saluran udara tegangan ekstra tinggi. Thesis.tahun 2002
2. Perbedaan tingkat kecemasan penduduk yang bermukim di bawah saluran udara tegangan ekstra tinggi.tahun 2003
3. Perbedaan tingkat pengetahuan kesehatan reproduksi antara murid kelas IV dan kelas V di SD Al Firdaus Surakarta.tahun 2004
4. Personal higiene dan sanitasi lingkungan di beberapa pedagang makanan kaki lima di Surakarta.tahun 2005
5. Kandungan bakteri patogen pada alat makan warung makan kaki lima di kecamatan jebres, surakarta.tahun 2006.
6. Pengaruh pelatihan sanitasi makanan terhadap pengetahuan dan sikap pedagang makanan kaki lima di kecamatan jebres, surakarta,tahun 2006
7. Pengembangan Instrumen Penilaian Laporan Mahasiswa menjadi Instrumen evaluasi formatif pada pembelajaran dengan sistem Problem Based Learning, tahun 2008.
8. Hubungan Komunikasi Orang tua dengan Perilaku seksual pada remaja di Surakarta, tahun 2010
9. Pengaruh radiasi gelombang elektromagnetik terhadap folikel ovarium mencit in vivo, 2010
10. Pengaruh Pendidikan Formal orang tua dengan Perilaku seksual pada remaja di Surakarta, tahun 2011
11. Efek Ekstrak Jahe terhadap fungsi reproduksi pada tikus jantan yang dipapari panas tahun 2011.
12. Partisipasi pembuatan Modul Blok Reproduksi, Cardiovaskuler, Kedokteran Kerja FK UNS tahun 2011
13. Pengaruh tekanan panas terhadap kualitas spermatozoa dan kadar testosterone pada tikus in vivo tahun 2011
14. Hubungan antara kadar Hb dengan kelelahan kerja dan produktivitas pada pekerja pabrik batik tulis di Kota Surakarta tahun 2012
15. Hubungan antara ISK dengan kelelahan kerja dan produktivitas kerja pada pekerja pabrik batik tulis di Kota Surakarta tahun 2013
16. Apoptosis spermatozoa manusia in vitro akibat pajanan radiasi non pengion ponsel sebagai kandidat immunokontrasepsi tahun 2014
17. Pengembangan kontrasepsi pada pria dengan menggunakan pajanan radiasi elektromagnetik radiofrekuensi untuk menghambat ekspresi *Voltage Gate Calcium Channel* (VGCC) tahun 2015

BUKU DAN PUBLIKASI ILMIAH

1. Pengaruh Paparan Medan Elektromagnetik terhadap Sel Darah Putih Manusia. Sain Kesehatan Berkala Penelitian Pascasarjana Ilmu-ilmu Kesehatan UGM, 18 (1) Jan, 2005. ISSN 1411-6197
2. Pengaruh Perbedaan Intensitas Kebisingan Pesawat Udara terhadap Gambaran Struktur Histologi Duodenum pada Tikus Putih (*rattus norvegicus*). Jurnal Enviro (Jurnal ilmiah lingkungan hidup) Vol 9 No.1, Maret 2007,ISSN 1411-4402,Pusat Lingkungan Hidup, UNS Surakarta
3. Kandungan Bakteri Patogen pada Alat Makan Warung Makan Kaki Lima di Kecamatan Jebres Surakarta. Nexus medicus (jurnal ilmiah & penelitian medis) ISSN 0216-7557, Vol. 18 No.1 Desember 2007
4. Rencana Renovasi Pasar Klewer terhadap Jumlah Penderita Sindroma Dispepsia pada Pedagang. Jurnal Enviro (Jurnal ilmiah lingkungan hidup) Vol 12 No.1, Juli 2008

PERTEMUAN ILMIAH

1. Pengaruh Paparan Gelombang Elektromagnetik Frekuensi Ekstrim Rendah Terhadap Spermatogenesis Mencit (*Mus Musculus L*) Dalam Proceeding Pertemuan Ilmiah Tahunan Persandi Pandi 21-24 April 2010.
2. SEMINAR ILMIAH tema : Pengaruh Radiasi Handphone terhadap Kecerdasan Otak. Tanggal 20 Agustus 2008 (Pembicara)
3. SEMINAR ILMIAH tema : Pengaruh gelombang elektromagnet terhadap kesehatan. Tanggal 4 September 2009 (pembicara)
4. National peer education workshop. Tanggal 13-15 Maret 2009
5. Pelatihan Penyegaran Tutor Fakultas Kedokteran UNS tanggal 23-24 Februari 2010 (pembicara)
6. Workshop Pengembangan Kurikulum Pendidikan Program Profesi FK UNS, 7,14,dan 15 April 2010 (pembicara)
7. Simposium PIT PERSANDI Development Of Andrology For Better Health Future, 22-23 April 2010 di Lor In Hotel Solo
8. Seminar PIT PERSANDI PANDI XVIII Sex yang sehat untuk awet muda, 24 April 2010

9. Workshop Penyusunan Bank Soal UKDI FK UNS,22 sep-27 okt 2010 (pembicara)
10. Annual Scientific Meeting (ASM) 2011 Safety and Quality in Health,27 feb-13 maret 2011
11. Pelatihan Penulisan Proposal Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat Kompetitif, 14 Maret 2011 (pembicara)
12. Workshop Regional Item Review Soal UKDI 27-28 April 2011
13. Pelatihan Penulisan Skenario Sebagai Pemicu Tutorial,5 Juli 2011(pembicara)
14. Workshop Penulisan Soal Berbasis Kompetensi,14 Juli 2011(pembicara)
15. Workshop evaluasi kurikulum berbasis kompetensi , 16 Juli 2011 (pembicara)
16. Lokakarya Evaluasi dan Revisi Modul Blok Semester Ganjil 2011/2012, 26 Juli 2011 (pembicara)
17. Pelatihan /Training Of Tutor FK UNS tahun 2011 (pembicara)
18. Seminar Nasional : Saatnya mengerti, saatnya peduli kesehatan reproduksi dan seksual,19 September 2011(pembicara)
19. Workshop : Reproductive Health Women During the Life cycle, 21 September 2011 (pembicara)

PEMAKALAH SEMINAR ILMIAH (oral presentation)

1. Kongres Temu Ilmiah Nasional Dokter Okupasi dengan judul : Pengaruh paparan radiasi gelombang elektromagnetik terhadap sistem reproduksi mencit, tahun 2010.
2. Konas 2 Psikoneuroimunologi Current Hope How the Mind and Body Work Together dengan judul : Respom immunitas pada paparan radiasi gelombang elektromagnetik, tahun 2011
3. The fifth International Asian Association of Indigenous and Cultural Psychology Conference Stress, Health, and Well-Being dengan judul : Patophysiological Responses to RF-EMW cell phone exposure : Stress protein and Oxidative stress with focus on Hippocampus and system reproductive , tahun 2014

4. International Conference APCHI, ERGOFUTURE, PEI, IAIFI
dengan judul : Steroid hormone and calcium antagonist affect
expression of CatSper channels in human spermatozoa, tahun 2014

PENGABDIAN PADA MASYARAKAT

1. Penyuluhan Deteksi Dini Gangguan Orientasi Seksual pada Anak
tahun 2011
2. Penyuluhan tentang menopause terhadap kesehatan ibu tahun 2012
3. Penyuluhan tentang paparan radiasi gelombang elektromagnetik tahun
2013
4. Penyuluhan tentang penggunaan radiasi gelombang elektromagnetik
sebagai alat kontrasepsi pria tahun 2014.

PENGHARGAAN

:

1. Lulusan Magister Cumlaude Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah
Mada tahun 2002
2. Pembimbing Lomba Penelitian Kreativitas Mahasiswa Tingkat
Nasional tahun 2009
3. Satyalencana Karyasatya X tahun 2011

HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Dr. Moewardi General Hospital
RSUD Dr. Moewardi

School of Medicine Sebelas Maret University
Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 623 / XI / HREC / 2014

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas
Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

Maret University Of Surakarta, after reviewing the proposal design, herewith to certify
Surakarta, setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan

That the research proposal with topic :
Bahwa usulan penelitian dengan judul

**PAJANAN RADIASI GELOMBANG ELEKTROMAGNETIK RADIOFREKUENSI
TELEPON SELULER TERHADAP KUALITAS DAN FUNGSIONALITAS
SPERMATOZOA MANUSIA**

Principal investigator : Isna Qadrijati, dr., M.Kes
Peneliti Utama 196701301996032001

Location of research : PK FK UGM
Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
Dinyatakan laik etik

Issued on : 05 November 2014



Chairman
Ketua

Dr. Hari Wijoso, dr., Sp.F.MM
NIP. 19621022 199503 1 001



Kementerian Pendidikan Nasional
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA
BAGIAN ILMU FAAL
Alamat :Gd.Prof.Drs.Med.Radiopetro Lt.V Sekip Utara, Yogyakarta 55281,
Telp. (0274)6492492 Fax. (0274) 561196, 581876

SURAT KETERANGAN

Nomor : UGM/KU/F/ *15* /UM/04/16.14

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama	: Dr.dr. Denny Agustiniingsih, M.Kes.
NIP	: 196908221996012001
Pangkat/Gol.	: Pembina/Lektor Kepala/IVA
Jabatan	: Kepala Bagian Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UGM
Unit Kerja	: Bagian Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UGM
Instansi	: Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Menyatakan bahwa :

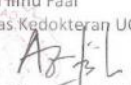
Nama	: dr. Isna Qadrijati
No. Mahasiswa	: 11/324335/SKU/421
Perguruan Tinggi	: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

Menerangkan dengan sebenar-benarnya bahwa yang bersangkutan telah selesai melaksanakan penelitian di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta mulai tanggal 08 s/d 18 Desember 2014, dengan judul: "*Pajanan radiasi gelombang elektromagnetik radio frekuensi telepon seluler terhadap kualitas dan fungsionalitas spermatozoa manusia.*" Kajian in vitro jumlah, motilitas, ekspresi voltage gated calcium channel dan ekspresi apoptosis serta konsentrasi ca intraseluler pada spermatozoa.

Demikian Surat Keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 26 Januari 2015

Kepala
Bagian Ilmu Faal
Fakultas Kedokteran UGM


Dr.dr. Denny Agustiniingsih, M.Kes.
NIP.: 196908221996012001



BAGIAN HISTOLOGI DAN BIOLOGI SEL

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

Sekip, Yogyakarta, Indonesia 55281 Tel/Fax: +62-274-546486

Email: histocellbiol@ugm.ac.id Website: <http://fk.ugm.ac.id/histologycellbiology>

SURAT KETERANGAN

NO : UGM/KU-Histo/ ~~23~~ /PL/04/07

Yang bertanda tangan dibawah ini Kepala Bagian Histologi dan Biologi Sel FK – UGM menerangkan bahwa :

Nama : Isna Qadrijati, dr., M.Kes.

Pekerjaan : Mahasiswa S2

Institusi : Lab. Fisiologi FK UNS

Judul : PAJANAN RADIASI GELOMBANG ELEKTROMAGNETIK
RADIOFREKUENSI TELEPON SELULER TERHADAP
KUALITAS DAN FUNGSIONALITAS SPERMATOZOA
MANUSIA

Kajian *in vitro* jumlah, motilitas, morfologi, ekspresi *Voltage Gated Calcium Channel* (VGCC), dan apoptosis spermatozoa

Pelaksanaan : Desember 2014 – Januari 2015

No. Penelitian : LHP -14 / 030

Menyatakan bahwa yang bersangkutan telah selesai melaksanakan penelitian di Bagian Histologi dan Biologi Sel FK-UGM dan telah menyelesaikan kewajiban administrasinya. Demikianlah surat keterangan ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Pembimbing Laboratorium,



Dr. Drs. Muhammad Ghufroon, MS.

Yogyakarta, ~~23~~ April 2015

Mengetahui,

Kepala Bagian

Histologi dan Biologi Sel FK-UGM



Dewi K. Paramita, S.Si.Msi. Ph.D



**PAJANAN RADIASI GELOMBANG ELEKTROMAGNETIK RADIOFREKUENSI TELEPON SELULER
TERHADAP KUALITAS DAN**

**FUNGSIONALITAS SPERMATOZOA MANUSIA Kajian in vitro Konsentrasi, Motilitas, Morfologi,
Apoptosis,**

Kalsium Intraseluler dan Ekspresi Voltage-Gated Calcium Channel Spermatozoa

ISNA QADRIJATI, Prof.dr.Sri Kadarsih Soejono, M.Sc.,Ph.D; Prof. dr. Muhammad Anwar, Sp.OG.,M.Med.Sc.;8. Dr. I

Universitas Gadjah Mada, 2016 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>