



ISBN: 978-602-097-251-0



Pertemuan Ilmiah Tahunan Persandi VI Pandi XX

LIFE EXTENSION STRATEGIES AND RECENT REPRODUCTIVE HEALTH ISSUES

Hotel Patrajasa, 18 - 20 April 2012, Semarang

DAFTAR ISI

SUSUNAN ACARA PIT PERSANDI 2012.....	6
• WORKSHOP MALE INFERTILITY.....	6
• WORKSHOP SEXUAL DYSFUNCTION	6
• SIMPOSIUM, KAMIS 19 APRIL 2012	7
• SIMPOSIUM, JUM'AT 20 APRIL 2012	8
KATA PENGANTAR	11
WORKSHOP.....	12
1. GENE ANALYSIS IN INFERTILE MAN, Sultana MH Faradz	13
2. ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF HYPOACTIVE SEXUAL DESIRE DISORDER, Wimpie Pangkahila	14
3. SPERMATOGENESIS STAGING AND TESTIS XENOGRAFTING, Susilo Wibowo	16
4. THE ROLE OF INTRA UTERINE INSEMINATION IN MALE INFERTILITY MANAGEMENT, Aucky Hinting	19
5. PREMATURE EJACULATION: FROM A PSYCHOGENIC TO A BIOGENIC DISORDER, Johannes Soedjono.....	21
6. CHRONIC ENDOMETRITIS A COMMON CAUSE OF IMPLANTATION FAILURE OF IVF, Fadjar Siswanto	23
7. FAKTOR PSIKOLOGIS VAGINISMUS DAN DISPAREUNIA, Muchammad Syamsulhadi	25
8. ENVIRONMENTAL TOXINS IMPACT ON COUPLE INFERTILITY: PREVENTION AND TREATMENT OPTIONS, Tri Indah Winarni, Susilo Wibowo.....	27
9. SEX THERAPY AS A TREATMENT OF PREMATURE EJACULATION, J. Alex Pangkahila	28

SIMPOSIUM	31
10. LIFE STYLE AND ENVIRONMENT EPIGENETIC AND EPIGENOMIC OVERVIEW THEIR RELATION TO HEALTH AND HERITABILITY OF THE DISEASES, Susilo Wibowo.....	32
11. IDEAL SEX SURVEY IN INDONESIA, Bang-Ping Jiann.....	36
12. TESTOSTERONE APPLICATION IN ANDROLOGY, Nukman Moeloek	38
13. RADIKAL BEBAS DAN AKIBATNYA :TINJAUAN PADA PROSES PENUAAN DAN SISTEM REPRODUKSI PRIA, Dicky Moch Rizal	41
14. TESTOSTERONE DEFICIENCY AND METABOLIC SYNDROME THE EVIDANCE, Nugroho Setiawan	42
15. UJI KEMAMPUAN SPERMA DARI TRANSPORTASI HINGGA FERTILISASI, Tri Bowo Hasmoro,	44
16. WHAT IS NEW AND WHAT IS TRUE OF PDE5 INHIBITOR ?, Nugroho Setiawan,.....	46
17. VASCULAR HEALTH AND TESTOTERONE CONCETRATION, Ismoyo Sunu	47
18. MALE HORMONAL, WHAT TO DO WHEN THE PATIENT DOES NOT RESPOND, Obrien S. Tendean	48
19. WHAT ARE THE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES FOR MALE INFERTILITY?, Aucky Hinting	52
20. LABORATORY EXAMINATION TO DETECT ANTISPERM-ANTIBODY IN MALE AND FEMALE, M.P. Budyandini D. Pramesti.....	53
21. SEXUAL FUNCTION POST NEO-VAGINOPLASTY, Gatut Hardianto, Suhartono DS,	54
22. THE EFFECT OF OXYGEN FREE RADICALS ON HUMAN SPERM FUNCTION AND AGING, Taufiqurrachman.....	55
23. FROM HERBS TO PHYTO-PHARMACEUTICALS, FACTS OR ANECDOTAL IN DELAYING AGING, FX Arif Adimoelja	57
24. WHAT AGING MEANS TO MEN'S HEALTH, FX Arif Adimoelja,.....	59

25. GENETIC AND ENVIRONMENTS ROLES ON AGING PROCESS AND REPRODUCTIVE ORGAN DEVELOPMENT, Sultana MH. Faradz	61
26. A NEW DISCOVERY OF THE MECHANISM OF PDE-5I TO PROMOTE HARDNESS AND DURATION OF PENILE ERECTION, FX Arif Adimoelja, .	62
27. CAN WE PROTECT SPERMATOGENESIS AGAINST TESTICULAR INSULT, Taufiqurrachman Nasihun	65
28. SAFETY AND EFFICACY OF GROWTH HORMONE REPLACEMENT THERAPY IN AGING MALE, Susilo Wibowo	67
29. GANGGUAN DORONGAN SEKSUAL PADA WANITA, Ariawan Soejoenoes	71
30. ASSESSMENT OF ADVERSE EFFECTS OF TESTOSTERONE REPLACEMENT THERAPY – WHAT TO DO?, Johannes Soedjono	76
31. CALORIE RESTRICTION TO ENHANCES QUALITY OF LIFE IN AGING, Susilo Wibowo.....	78
32. IMMUNE RESPONSES ON MALE REPRODUCTIVE INFECTION AND ITS TREATMENT, Indra G. Mansur	82
33. FETAL HYPOGONADISM AND DISORDERS OF MALE SEXUAL DEVELOPMENT, Kiagus Muhammad Arsyad.....	84
34. ERECTILE DYSFUNCTION AS AN INDICATOR OF AGING PROCESS, Wimpie Pangkahila	85
35. ELEMEN IMUN PADA TESTIS MANUSIA SEBAGAI <i>IMMUNE PRIVILEGE SITE</i> , Kiagus Muhammad Arsyad.....	87
36. PSYCHOLOGICAL ASPECTS : DIFFICULTY TO GET EXCITATION AND ORGASM, Hastaning Sakti.....	88
37. HIV IN HUMAN SEMEN, Hudl Winarso.....	98
38. SOURCES AND FUNCTIONS OF PROSTAGLANDINS IN THE TESTIS: EVIDENCE FOR THEIR RELEVANCE IN MALE (IN)FERTILITY, Herman Wibisono	99
39. EXERCISE THAT ENHANCES TESTOSTERONE CONCENTRATION AND PREVENT MALE PREMATURE AGING, Nugroho Setiawan	101
FREE PAPER.....	102

40. PROFILE OF MALE REPRODUCTIVE SYSTEM IN JUVENILE, IMMATURE, AND MATURE WISTAR RATS (*RATTUS NORVEGICUS* BERKENHOUT, 1769), Laksmindra F., 103
41. EFEK EKSTRAK KUDA LAUT (*HIPPOCAMPUS KUDA BLEEKER*) TERHADAP KUANTITAS DAN KUALITAS SPERMATOZOA MENCIT PUTIH (*MUS MUSCULUS L.*), Trisnawati,S.Si, M.Kes 104
42. SEXUAL DYSFUNCTION IN SCHIZOPHRENIA, Anries K Sodak 106
43. TIGA PULUH DELAPAN PERSEN PRIA LANSIA MENDERITA DIABETES, KADAR TESTOSTERONE DAN PROTEIN IKAT HORMON SEX MENURUN, ML Edy Parwanto 112
44. BEYOND PROSTATE CANCER (PC) : INACCURATE AND UNDERTREATED IN ELDERLY (CLINICAL REVIEW), Djoko Trihadi 114
45. THE DEVELOPMENT OF JUSTICIA GENDARUSSA BURM.FAS MALE CONTRACEPTION, Dyan Pramesti 116
46. AGEING PROCESS CAN WE STOP?, Rudi Juwana 118
47. HUBUNGAN TESTOSTERON DENGAN SEL SPERMATOGENIK TIKUS PUTIH JANTAN (*Ratus norvegicus*) SETELAH DIBERI SENYAWA AKTIF DAUN BELUNTAS, Eko Susetyarini 123
48. PERANAN PROTEIN DEFENSIN BETA DALAM MATURASI SPERMA, Evelyn Loanda 124
49. PEMISAHAN SPERMATOZOA X DAN Y DENGAN KATODA - ANODA SECARA IN VITRO, Musanip 131
50. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) UNTUK KONFIRMASI PEMISAHAN SPERMATOZOA X DAN Y DENGAN METODE ASAM – BASA, Moch.Maswan, 132
51. PENGARUH DOSIS BERULANG FILTRAT BUNGA SEPATU (*Hibiscus rosasinensis*) TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN, Roimil Latifa 133
52. IN VITRO EFFECTS OF KY JELLY® AND DUREX PLAY® ON HUMAN SPERM QUALITY IN REPRODUCTIVE AGE 136

53. MEASUREMENT OF OXYGEN SATURATION USING A PENIS WITH FINGER TIP PULSE OXIMETER IN PATIENTS WITH ERECTILE DYSFUNCTION, Supardi..... 137
54. HUBUNGAN ANTARA DIABETES MELLITUS DENGAN ANDROPAUSE, FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS SEBELAS MARET SURAKARTA, Endang Sahir, M.Sc dan Lodewyx Bobby Nindra Nugraha.....136

The effect of Oxygen free Radicals on Human Sperm Function and Aging

By: Taufiqurrachman
(Medical college of Sultan Agung Islamic University)

Abstrak

Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa stress oksidative (SO) mempunyai peran penting bahkan sebagai faktor penyebab dalam berbagai proses degenerative, proses penuaan, dan infertilitas. SO disebabkan oleh peningkatan produksi reactive oxygen species (ROS) dan penurunan aktivitas antioxidant scavenging.

Spermatozoa yang diproduksi di dalam testis sampai diejakulasikan ke dalam traktus reproduksi wanita berada dalam lingkungan yang bersifat oksidative. Di sisi lain spermatozoa sangat sensitive terhadap ROS, akibat kandungan asam lemak tidak jenuh pada membran spermatozoa yang sangat tinggi. Jumlah sitoplasma yang sangat sedikit, menyebabkan spermatozoa mempunyai kemampuan yang terbatas dalam memproduksi antioxidant dan mereparasi DNA. Oleh karena itu keberadaan ROS dalam ejakulat dan traktus reroduksi wanita sangat berpotensi mengganggu fertilitas pria melalui penurunan fungsi spermatozoa.

ROS, selain berperan dalam penurunan fungsi spermatozoa, juga berperan dalam proses penuaan biologis. Di antara berbagai teori penuaan, teori radikal bebas telah mendapat perhatian besar dan diterima secara luas oleh berbagai ahli. Teori radikal bebas lebih dapat menjelaskan bagaimana proses penuaan berlangsung. Penuaan adalah konsekuensi dari akumulasi kerusakan biomolekul yang disebabkan oleh ROS yang diproduksi oleh sel setelah menggunakan oxygen. Oxygen sangat diperlukan dalam respirasi mitochondria, oleh karena itu mitochondria dan DNANYa (mtDNA) merupakan target utama oksidasi terutama pada sel posmitotik. Kemampuan meregenerasi mtDNA sel postmitotik tidak dapat berlangsung secara penuh, maka kerusakan mtDNA merupakan permulaan proses penuaan.

Secara fisiologis ROS adalah produk sampingan dari proses enzymatic oksidasi reduksi di dalam sel. Beberapa sel bahkan secara inherent memproduksi ROS untuk kepentingan fisiologis. ROS yang diproduksi oleh leukosit misalnya, sangat berguna untuk pertahanan tubuh, ROS yang diproduksi oleh spermatozoa berfungsi untuk kapasitas, hiperaktivasi, dan fusi spermatozoa dengan oosit. ROS bersifat sangat reactive dan destructive terhadap struktur sel, oleh karena itu ROS dapat bersifat dual action yaitu fisiologis dalam kadar rendah dan patologis pada kadar tinggi. Agar tidak terjadi stress oksidative diperlukan keseimbangan yang tepat antara prooxidant dan antioxidant di dalam sel. Demi tujuan tersebut sel mengekspresikan berbagai gen protein antioxidant seperti superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), dan glutathione peroxidase (GPX). Berbagai kondisi, baik yang berasal dari internal maupun eksternal tubuh dapat menggeser keseimbangan ke arah prooksidan sehingga menimbulkan stress oksidative, infertilitas, dan penuaan.

Kata kunci: ROS, aging, fungsi sperma

Abstract

Various scientific evidences elucidated that oxidative stress (OS) have pivotal role, instead as a causative factor of many degenerative processes, aging, and infertility. OS is caused by increase in production of reactive oxygen species (ROS) and decrease in antioxidant scavenging activity.

Spermatozoa were produced within the testis unto ejaculated into reproductive female tracts, continuously exposed in oxidative environmental condition. On the other hand spermatozoa are very sensitive to ROS, due to high level of unsaturated fatty acid in the spermatozoa membrane. The little amount of sperm cytoplasm will result in sperm possess a limited ability to produce antioxidant and DNA repairing. Accordingly, the existence of ROS in ejaculates and female reproductive tracts will be a highly potential to influent male infertility status via declining sperm functions.

In addition to declines sperm functions, ROS also have the role in biological aging. Among other aging theories, the free radicals theories are most prominent and have been accepted by large extent of scientist. The free radicals theories may explain the causes of aging better rather than many other theories. Aging is the consequence of biomolecular damage accumulation caused by ROS produced by the cell that have been oxygen consuming. Oxygen is highly necessitated in mitochondrial respiration, thus mitochondria and its DNA (mtDNA) as an oxidation target in mitochondrial respiratory, especially in postmitotic cells. Meanwhile the repairing ability of mtDNA in postmitotic cells is extremely low, therefore when the mtDNA damage the aging process is initiated.

ROS, physiologically is byproduct of enzymatic oxidation-reduction process within cells. Several cells inherently instead producing ROS in charge with physiological function. For instance ROS which is produced by leucocytes are very useful for defense mechanism, and ROS produced by spermatozoa have some very important role for capitation, hyperactivation, and sperm-oozyte fusion. ROS is highly reactive and destructive toward cellular structures, therefore ROS have dual action effect, physiologic in low level, and pathologic in high level. To avoid cells undergo oxidative stress, the antioxidant and pro-oxidant balance in cells are needed. For these purposes cells have been expressing several protein antioxidant genes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX). Various conditions arise from internal and external human bodies may push aside the balance to pro-oxidant, therefore inducing oxidative stress, infertility, and aging.

Key word: ROS, aging, sperm function

Pendahuluan

Pria mempunyai kontribusi 50% terhadap kejadian infertilitas pada pasangan usia subur.¹ Indikator fertilitas pria ditentukan berdasarkan parameter sperma yang terdiri dari konsentrasi, motilitas, morfologi, dan fragmentasi DNA.² Kualitas parameter sperma semakin menurun sesuai dengan penambahan usia atau penuaan biologis pria. Penyebab utama penurunan kualitas parameter sperma maupun penuaan biologis adalah stress oksidatif (SO).^{3,4} SO disebabkan oleh peningkatan produksi reactive oxygen species (ROS) dan atau penurunan aktivitas antioxidant scavenging.⁵

Kandungan asam lemak tidak jenuh yang tinggi pada membran spermatozoa, menyebabkan sangat sensitive terhadap ROS. Jumlah sitoplasma yang terbatas, menyebabkan spermatozoa tidak mempunyai kemampuan yang cukup untuk memproduksi antioxidant dan reparasi DNA.^{3,5} Kondisi demikian, menyebabkan eksistensi ROS dalam ejakulat dan traktus reproduksi wanita sangat berpotensi mengganggu fungsi spermatozoa. ROS, juga berperan dalam proses penuaan biologis. Di antara berbagai teori penuaan, teori radikal bebas yang pertama kali dikemukakan oleh Harman telah mendapat perhatian besar dan diterima secara luas oleh berbagai ahli.⁶ Hal ini disebabkan karena teori radikal bebas lebih dapat menjelaskan bagaimana

proses penuaan berlangsung daripada teori penuaan lain. Berbagai studi menunjukkan bahwa penuaan adalah konsekuensi dari akumulasi kerusakan biomolekul yang disebabkan oleh ROS yang diproduksi oleh sel setelah menggunakan oxygen.⁷ Mengingat oxygen sangat diperlukan dalam respirasi untuk mendukung proses metabolisme dalam mitochondria, maka mitochondria dan DNA mitochondria (mtDNA) merupakan target utama dari oksidasi terutama pada sel posmitotik. Mengingat mtDNA sel postmitotik tidak mampu mereparasi diri, maka mtDNA yang mengalami kerusakan merupakan permulaan proses penuaan.⁴

Secara fisiologis ROS adalah produk sampingan dari proses enzymatic oksidasi reduksi di dalam sel. Beberapa sel bahkan secara inherent memproduksi ROS untuk kepentingan fisiologis. Sebagai contoh ROS yang diproduksi oleh leukosit, sangat berguna untuk pertahanan tubuh. ROS yang diproduksi oleh spermatozoa diperlukan untuk menjalankan fungsi kapasitas, hiperaktivasi, dan fusi spermatozoa dengan oosit. Di sisi lain ROS bersifat sitotoksik, sangat reactive, dan destructive terhadap struktur sel.^{3,5} Sebagai konsekuensi, ROS dapat bersifat dual action yaitu fisiologis dalam kadar rendah dan patologis pada kadar tinggi. Untuk mencegah agar tidak terjadi stress oksidative diperlukan keseimbangan yang tepat antara prooxidant dan antioxidant di dalam sel. Demi tujuan tersebut sel mengekspresikan berbagai gen protein antioxidant seperti superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), dan glutathione peroxidase (GPx).⁵ Lebih lanjut, bila terjadi peningkatan kadar ROS dalam lingkungan sel, segera dinetralkan oleh SOD, CAT, dan GPx,³ namun bila kadar ROS terlalu tinggi, sehingga ketiga enzyme tersebut dan antioksidan lain tidak mampu lagi menetralkan, maka sel akan mengalami stress oksidative. Berbagai kondisi, baik yang berasal dari internal maupun eksternal tubuh dapat menggeser keseimbangan ke arah prooksidan sehingga menimbulkan stress oksidative sel dan penuaan.

Sumber ROS dalam Tubuh

Sebagai organisme aerobik dalam 24 jam manusia bernafas kurang lebih 23 ribu kali dan menghirup oksigen sebanyak 352.81 lt untuk menjalankan metabolisme basal. Konsekuensi dari proses metabolisme tersebut, system biokimiawi dalam tubuh menghasilkan ROS sebanyak 1 - 3% dari total kebutuhan oksigen atau sebanyak 3.4 kg/24 jam.^{8,9} Secara sederhana ROS didefinisikan sebagai atom atau kelompok atom yang mempunyai electron tidak berpasangan, oleh karena itu sangat reaktif.^{3,5} ROS terdiri dari oksigen superoksida (O_2^{\cdot}), radikal hidroksi (OH^{\cdot}), radikal peroksil (ROO^{\cdot}), dan hydrogen peroksida (H_2O_2).^{3,10} Sebagian ahli berpendapat bahwa H_2O_2 , tidak termasuk dalam radikal bebas sebelum dikonversi menjadi molekul radikal bebas lain. Berbagai jenis radikal bebas sebagaimana tersebut di atas, O_2^{\cdot} disebut sebagai ROS primer, sedangkan yang lain disebut sebagai ROS sekunder. Anion superoksida disebut sebagai ROS primer karena dapat dikonversi menjadi ROS sekunder melalui interaksi dengan molekul lain atau melalui proses katalisasi enzim metal (cytochrom).^{10,11}

Sampai saat ini terdapat empat sumber ROS endogen yang telah berhasil diidentifikasi. Empat sumber tersebut adalah:^{10,12} i), mitochondria, suatu organel sel, merupakan tempat fosforilasi oksidatif berlangsung, menghasilkan ROS sebagai produk sampingan selama proses transfer electron. ii), sel fagositosis seperti netrofil, eosinofil, dan makrofag yang mampu membentuk ROS pada saat ledakan oksidatif. iii), peroksisom yang menghasilkan H_2O_2 dalam kondisi fisiologis. iv), enzim cytochrome P450 yang mengoksidasi asam lemak tidak jenuh dan mereduksi molekul oksigen membentuk radikal anion superoksida dan atau H_2O_2 . Namun demikian, setiap ROS dapat berasal dari satu sumber atau lebih, sebagai contoh radikal O_2^{\cdot} , disintesis dari reduksi satu electron oksigen oleh berbagai reaksi yang dikatalisis oleh enzim

oksidase yang meliputi: autooksidasi hemoglobin, cytochrom P450 reduktase, xanthine oksidase, NADPH oksidase, cycloooksigenase, eNOS dalam kondisi tertentu, dan transport electron selama reaksi fosforilasi oksidatif dalam mitokondria untuk menghasilkan ATP. Radikal OH^\bullet dibentuk dari dekomposisi H_2O_2 dan radikal peroksil ROO^\bullet yang diinduksi oleh Fe^{++} atau copper yang dikenal dengan reaksi Fenton dan Heberweis.¹³ H_2O_2 sendiri dibentuk dari reaksi yang dikatalisis oleh enzyme oksidase, atau oleh reaksi penambahan electron dan gugus hydrogen (1H) pada molekul O_2 . H_2O_2 juga disintesis oleh peroksisom dengan mentransfer dua electron dari FADH_2 ke O_2 yang kemudian dengan mudah di konversi menjadi OH^\bullet . Selain itu, H_2O_2 juga dapat disintesis oleh sel phagosit selama proses inflamasi yang melibatkan enzim cytochrome b dengan mentransfer electron dari NDPH ke O_2 membentuk superoksida kemudian H_2O_2 yang segera dirubah menjadi OH^\bullet oleh reaksi Fenton.¹³ Reaksi antara radikal OH^\bullet dengan gugus H dari asam lemak tidak jenuh fosfolipid membran sel menghasilkan lipid radikal yang kemudian bereaksi dengan O_2 membentuk radikal peroksil ROO^\bullet dan malondialdehid (MDA).^{3,5} ROS juga dapat dibentuk oleh radiasi kosmis, asap, dan obat atau zat kimia lain yang dimakan.¹⁰ Di antara berbagai ROS tersebut yang penting, paling reaktif, dan berbahaya adalah OH^\bullet . Hal tersebut disebabkan karena OH^\bullet mampu bereaksi dengan protein, asam nukleat, lipid, dan molekul lain sehingga dapat menyebabkan perubahan struktur dan kerusakan sel. Setelah radikal OH^\bullet ROS yang paling reaktif adalah O_2^\bullet . Efek tersebut berhubungan dengan kemampuan O_2^\bullet untuk menstimulasi pengeluaran Fe dari feritin, lactoferin, dan transferin. Fe kemudian merubah H_2O_2 menjadi dua radikal OH^\bullet yang sangat reaktif melalui reaksi fenton.^{13,14}

Selain ROS, manusia sebagai organisme aerobik juga menghasilkan radikal bebas lain yang dikenal dengan reactive nitrogen species (RNS), seperti nitric oxide (NO^\bullet). NO^\bullet dihasilkan melalui system mitochondrial NO synthase (mtNOS) yang sensitive terhadap Ca^{++} , dengan air dan oksigen membentuk nitrat (NO_3) dan nitrit anion (ONOO^\bullet).^{9,10} Nitric oxide endogen disintesis dari asam amino L arginin yang dikatalisis oleh enzim NO syntase (NOS). NOS adalah enzim homodimer yang disusun oleh monomer mereka sendiri, kemudian bergabung dengan cytochrome reductase dan cytochrome yang memerlukan senyawa pembantu seperti L arginin, NADPH, dan oksigen, serta lima cofactor lain atau gugus protatik yaitu: FAD, FMN, calmodulin, tetrahydrobiopterin, dan heme. Dikenal tiga isoform NOS yang berbeda, dua di antara mereka adalah NOS yang tergantung pada $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ yaitu nNOS dan eNOS. Aktivitas nNOS diketahui pertamakali pada neuron yang terletak pada chromosom 12q24.2, sedangkan aktivitas eNOS pertamakali diidentifikasi dalam sel endothel dan terletak pada chromosom 7q35-36. Endothel NOS adalah enzim yang sangat penting dalam system cardiovascular. Endothelial NOS adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan NO, dalam system kardiovaskuler merupakan regulator kunci terhadap tekanan darah, remodeling pembuluh darah, dan angiogenesis. Regulasi tersebut dilakukan dengan mekanisme fosforilasi pada berbagai tempat. NOS lain yang telah diketahui yaitu iNOS yang terletak pada chromosom 17cenq12 dan tidak memerlukan Ca^{++} dalam melakukan aktivitas.¹⁰ iNOS adalah NOS yang terekspresi ketika terkena berbagai stressor seperti reaksi inflamasi, serta tersebar pada berbagai sel termasuk makrofag dan hepatosit. Dalam jaringan tertentu seperti otak, hati, tymus, dan jantung, terdapat bentuk NOS lain yang spesifik, kemudian dikenal dengan mtNOS. Dalam situasi fisiologis mtNOS dapat membentuk NO, secara reversible dan kompetitif dengan O_2 menghambat cytochrome C oxidase yang berperan penting dalam mengatur mitokondria. Dalam situasi tersebut, produksi oksigen superoksida pada rantai pernafasan dapat ditingkatkan dengan mengatur status redoks dari cytochrome C oksidase. Nitric oxide adalah molekul kecil yang sangat mudah larut, multifungsi, sangat reaktif, sebagai pembawa pesan intraseluler dalam

rangka meregulasi sel baik dalam kondisi fisiologis maupun patologis. Terlepas dari berbagai kondisi tersebut sintesis NO dimaksudkan untuk meregulasi komunikasi seluler yang meliputi: penyaluran signal saraf, relaksasi pembuluh darah, pembekuan darah, dan aktivitas hematopoisis stem sel. NO dapat berperan sebagai factor pro-anti oksidan, pro-anti apoptosis, dan pro-anti inflamasi tergantung kondisi lokal lingkungan (konsentrasi radikal bebas; pH) dan type sel.⁹ Peran pro-anti apoptosis dan pro-anti inflamasi tampak berhubungan dengan status redoks seluler yang merupakan konsekuensi dari produksi NO dan ketika bereaksi dengan molekul biologi lain seperti besi, gugus thiol, protein, asam nucleat, lipid, gula, ROS, dan ekspresi survival gen. NO secara langsung juga dapat berikatan dengan cytochrome C oksidase dalam rantai pernafasan, kemudian menginduksi pelepasan cytochrome C melalui perubahan potensial membran mitochondria dan merangsang kaskade signal apoptosis yang tergantung pada caspase. Dalam kondisi stress, radikal superoksida yang berasal dari mitochondria bereaksi dengan NO membentuk peroksi nitrit (ONOO⁻) yang menyebabkan disfungsi mitochondria pada tingkat membrane, pelepasan cytochrome C, dan apoptosis. Radikal OH dapat mengoksidasi nitrit menjadi nitrogen dioxide (NO₂), kemudian bereaksi dengan NO menghasilkan N₂O₃. Lebih lanjut NO juga dapat bereaksi dengan O₂ membentuk ONOO⁻, kemudian bereaksi dengan CO₂, lipid, dll membentuk radikal OH[•]. Dalam kondisi stress pembentukan NO seluler dan mitochondrial NO mengalami peningkatan, yang diikuti oleh peningkatan pelepasan O₂[•] sehingga terjadi akumulasi ONOO⁻. Akumulasi ONOO⁻ mengakibatkan perubahan fosforilasi oksidatif mitochondria dan Ca⁺⁺ homeostasis, yang berhubungan dengan berbagai penyakit seperti stroke, miocard infark, penyakit jantung coroner, diabetes, kanker, neurodegenerasi, dan aging.^{9,10}

ROS/RNS dan Aging

Aging dapat didefinisikan sebagai penurunan umum fungsi fisiologis organisme, sehingga kemampuan untuk melakukan reaksi adaptif terhadap perubahan lingkungan dan mempertahankan homeostasis sangat rendah.⁴ Akumulasi dari berbagai perubahan fungsi tersebut, sesuai dengan pertambahan waktu menyebabkan peningkatan risiko morbiditas penyakit maupun mortalitas. Mengacu pada definisi tersebut, maka aging, meskipun sebagian ahli berpendapat bukan merupakan penyakit, namun peluang untuk mendapatkan penyakit degenerative semakin meningkat. Sebagai konsekuensi, aging menyebabkan kehilangan efisiensi dalam semua fungsi fisiologis, terutama dalam mempertahankan homeostasis. Sebagai contoh kemampuan individu untuk menahan temperatur ekstrim, infeksi, atau stres semakin menurun. Oleh karena itu, secara prinsip, apabila karakteristik organisme muda atau sehat adalah mampu mempertahankan homeostasis, maka aging adalah kegagalan untuk mempertahankan homeostasis.⁴ Homeostasis adalah sebuah mekanisme kompensasi untuk mempertahankan kondisi internal agar tetap statis, meskipun terjadi perubahan kondisi lingkungan eksternal yang dinamis. Organ yang bertanggungjawab untuk mengontrol homeostasis dalam tubuh terutama adalah otak dengan syaraf, hormon, dan imunitas.⁴ Kerusakan pada ketiga sel jaringan posmitotik tersebut menyebabkan kemampuan homeostasis terganggu yang berdampak pada kerusakan sel, penurunan imunitas, dan penuaan. Di antara berbagai sebab kerusakan sel, stres oksidatif akibat serangan ROS/RNS adalah yang paling sering. Sumber ROS/RNS yang dianggap paling banyak dan potensial untuk menimbulkan stres oksidatif pada sel jaringan posmitotik adalah mitochondria.^{4,7} Teori radikal bebas-mitochondria, adalah teori yang dapat menjelaskan bagaimana penuaan berlangsung, pertama kali diusulkan oleh Harman.⁶ Saat ini muncul sekitar 300 teori tentang penuaan, secara garis besar dapat dikelompokkan menjadi 3

kelompok, yaitu teori genetic, epigenetic, dan evolusi. Hanya teori epigenetic yang dapat menjelaskan bagaimana proses penuaan berlangsung. Penuaan menurut teori epigenetic adalah penuaan yang berlangsung secara random, sangat dipengaruhi oleh ROS/RNS baik yang berasal dari lingkungan internal maupun eksternal.⁴ Sebagai contoh, studi pada dua individu yang lahir kembar satu telur, kemudian setelah beranjak dewasa dibiarkan hidup dan diasuh dalam lingkungan yang berbeda, ternyata mempunyai life span yang berbeda pula. Individu yang hidup dalam lingkungan baik mempunyai life span lebih panjang dibanding individu yang hidup di lingkungan buruk. Sesuai dengan teori genetic dua individu tersebut pasti mempunyai life span yang sama, tetapi dalam kenyataan berbeda. Mengacu pada bukti tersebut, maka genetic hanya menyumbang 5%, sedangkan epigenetic menyumbang 95% dalam proses penuaan.⁴

Mitochondria merupakan pusat pembentukan ATP dalam sel, terutama sel posmitotik, melalui mekanisme fosforilasi oksidatif. Sebagai konsekuensi, mitochondria (membran dan mtDNA), merupakan sasaran utama serangan ROS yang dihasilkan dari proses tersebut. Mengingat membran mitochondria tersusun oleh lipid bilayer, juga mengandung asam lemak tidak jenuh ganda, sehingga mudah mengalami peroksidasi. Demikian pula dengan mtDNA, selain sangat rentan terhadap lingkungan mutagenic, juga proteksi oleh histon sangat lemah,⁷ sehingga terjadi akumulasi kerusakan pada mtDNA. Akibat dari kerusakan dari mtDNA, 13 dari 60 enzim yang terlibat dalam fosforilasi oksidatif gagal dibentuk, sehingga fosforilasi oksidatif tidak berlangsung optimal. Sebagai konsekuensi, ROS lebih banyak dihasilkan pada kompleks I dan III dari rantai pernafasan selama reaksi fosforilasi oksidatif berlangsung, sehingga menambah kerusakan pada membran maupun mtDNA.^{9,10} Lebih lanjut, mtDNA pada sel posmitotik tidak mempunyai kemampuan untuk mereparasi diri, sehingga menambah kerusakan mtDNA. Kejadian interkoneksi tersebut akan terus berlangsung sampai sel mengalami apoptosis. Apoptosis juga dapat diinduksi oleh NO^{*} dari mtDNA yang berikatan dengan cytochrome C oksidase, kemudian melepaskan cytochrome C dan mengaktifkan caspase. Mengacu pada uraian tersebut, maka cepat atau lambat pemunculan penuaan sangat bergantung pada kecepatan pembentukan ROS/RNS, kandungan asam lemak tidak jenuh membran, dan kerusakan oksidatif mtDNA. Berbagai hasil studi menunjukkan bahwa tingkat pembentukan ROS, kandungan asam lemak tidak jenuh membran, dan kerusakan mtDNA lebih rendah pada spesies yang mempunyai life span panjang dibanding spesies dengan life span pendek.⁴

Sumber ROS dalam Ejakulat

Ejakulat manusia adalah cairan yang disekresikan oleh berbagai kelenjar aksesori seks yang terdiri dari kelenjar bulboouretral, prostat, ductus deferens, epididimis, dan vesikula seminalis. Secret yang dikeluarkan oleh kelenjar bulbouretralis adalah glikoprotein, bersifat alkalin, dan berfungsi untuk menetralkan dan membasahi ductus urinarius sebelum ejakulasi. Kelenjar prostat, mengeluarkan cairan prostat bersama dengan spermatozoa yang berasal dari epididimis dan ductus deferens dengan berkontraksi secara simultan. Sementara kelenjar vesikula seminalis mendapat giliran untuk mengeluarkan cairan paling akhir, dengan volume paling besar, dan berisi pellet untuk spermatozoa. Ejakulat pada saat diejakulasikan masih dalam bentuk coagulum, akibat reaksi yang terjadi antara komponen dari cairan prostat dengan protein dari kelenjar vesikula seminalis. Ejakulat kemudian mengalami likuifikasi akibat pengaruh *prostatic specific antigen* (PSA) dalam waktu 20 – 30 menit setelah ejakulasi.¹⁵ Akumulasi dari berbagai sekret yang disekresikan oleh berbagai kelenjar aksesori seks tersebut menyebabkan volume ejakulat berkisar antara 2 – 5 ml setiap ejakulasi. Volume dan kandungan ejakulat tersebut dapat

menggambarkan fungsi fisiologis kelenjar asesori seks dan testis apakah berlangsung secara normal atau tidak.

Setiap hari ratusan juta sel spermatogonium dibentuk menjadi spermatozoa dalam testis melalui proses yang dikenal dengan spermatogenesis. Sebagian sel spermatogonium berhasil diproses menjadi spermatozoa viable dan intak, sedangkan sebagian yang lain gagal diproses, sehingga tetap menjadi immatur, defek, atau mengalami apoptosis.^{1,3,5} Sebagai akibat, konsentrasi spermatozoa yang tersisa dalam ejakulat hanya tinggal separo, atau bahkan kurang, dengan kelainan bentuk, maupun gangguan motilitas sehingga disebut sebagai oligoasthenoteratozoospermia (OAT). Kegagalan spermatogenesis sebagaimana tersebut di atas, terutama disebabkan oleh stress oksidatif, sebagai akibat dari peningkatan ROS atau penurunan antioksidan. Dalam keadaan normal, ROS dengan kadar tertentu sangat dibutuhkan untuk mendorong fungsi spermatozoa seperti hyperaktivasi, capacitasi, akrosom reaksi, dan fertilisasi.¹⁶ Di sisi lain, bila kadar ROS sangat tinggi menyebabkan spermatozoa mengalami stres oksidatif. Akibat stres oksidatif spermatozoa menjadi immotile, defek morphology, fragmentasi DNA, bahkan mati sehingga terjadi penurunan konsentrasi.¹⁴ Untuk menjaga agar homeostasis tetap terjaga, dalam saluran reproduksi maupun ejakulat dilengkapi dengan system untuk menangkal peningkatan produksi ROS yang berlebihan. Sebuah system yang terdiri dari antioksidan enzymatic dan nonenzymatic tersebut, berfungsi untuk menjaga keseimbangan yang optimal dan sensitif antara antioksidan dan prooksidan. Namun, berbagai laporan menunjukkan bahwa 30% - 80% pria infertil adalah OAT yang berhubungan dengan kerusakan spermatozoa akibat stress oksidatif.^{1,17} Mengacu pada fakta tersebut, maka berbagai keadaan yang berhubungan atau bahkan menjadi factor predisposisi peningkatan ROS dalam ejakulat adalah:^{3,5,14} i, defek morfologi dan immatur spermatozoa; ii, kapasitas antioksidan pada ejakulat maupun spermatozoa sangat rendah; iii, inflamasi pada traktus genitalis.

Ejakulat sebagaimana tersebut di atas mengandung berbagai tipe sel, selain spermatozoa matur, juga mengandung sel spermatozoa immatur, sel bundar yang berasal dari berbagai tingkat spermatogenesis, leukosit, dan sel epitel. Di antara berbagai tipe sel tersebut, sel spermatozoa immatur dan sel leukosit merupakan sumber ROS yang paling dominan dalam ejakulat. Dalam kondisi fisiologis, selama proses spermiogenesis terjadi ekspulsi sitoplasma dari spermatozoa sebelum meninggalkan germinal epithelium. Defek spermiogenesis menyebabkan kegagalan ekspulsi sitoplasma sehingga spermatozoa tetap mengandung (retensi) sitoplasma residual yang sangat tinggi. Spermatozoa dengan karakteristik seperti itu tetap dianggap sebagai sel immatur dan cacat fungsi.¹⁸ Sitoplasma residual mengandung enzim glukosa 6 fosfat dehidrogenase (G6PD) dengan kadar yang tinggi. G6PD adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH). NADPH kemudian membentuk ROS melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim NADPH oksidase pada tingkat membran. Pembentukan ROS dalam sitoplasma residual juga dapat melalui system NADPH-dependent oxidoreductase (diphorase) pada mitochondria.⁵ Lebih lanjut, seperti disebutkan oleh berbagai laporan bahwa spermatozoa sangat memerlukan supply energy secara terus menerus untuk keperluan motilitas dan reparasi. Proses biokimiawi pada spermatozoa yang paling bertanggung jawab terhadap penyediaan energy adalah glykolisis dalam sitoplasma dan fosforilasi oksidatif dalam mitochondria.^{3,5,14} Proses biokimiawi tersebut dapat berlangsung optimal, apabila struktur dan fungsi membran mitochondria utuh. Peningkatan ROS pada spermatozoa dapat menyebabkan kerusakan membran mitochondria, dan kerusakan membran mitochondria menyebabkan peningkatan produksi ROS. Hubungan seperti itu merupakan fenomena lingkaran setan yang terus berjalan, saling mempengaruhi sampai sel mengalami kematian. Mengacu pada

uraian tersebut, maka retensi sitoplasma residual pada spermatozoa immatur merupakan sumber ROS yang sangat dominan.

Sumber ROS lain yang dominan dalam ejakulat adalah sel leukosit yang muncul pada saat inflamasi (infeksi) pada testis dan kelenjar asesori seks. Neutrophil merupakan sel leukosit yang paling banyak terdapat dalam ejakulat dan paling populer sebagai penghasil ROS melalui ledakan oksidatif ketika teraktivasi.³ Eksistensi leukosit dalam ejakulat disebut sebagai leukositospermia. World Health Organization (WHO) memberi batas leukocytospermia, apabila konsentrasi sel leukosit $>1 \times 10^6$ per ml ejakulat. Terdapat banyak kontroversi terhadap makna klinik dari leukositospermia tersebut. Di satu sisi penurunan kualitas parameter sperma seperti: penurunan motilitas dan konsentrasi, kerusakan morfologi, serta fragmentasi DNA telah dianggap disebabkan oleh leukositospermia. Di sisi lain tidak ada korelasi antara konsentrasi leukospermia dengan penurunan kualitas parameter sperma dan defek fungsi spermatozoa. Sebagian dari kontroversi tersebut dapat dijelaskan melalui aktivitas leukosit yang ada dalam ejakulat, aktif atau tidak aktif. Leukositospermia aktif ditandai dengan peningkatan sitokin proinflamator, sedangkan yang tidak aktif tidak ada peningkatan sitokin proinflamator. Berbagai penelitian melaporkan bahwa peningkatan aktivitas leukosit yang ditandai dengan proinflamator seperti IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α mempunyai korelasi positif dengan peningkatan ROS dan sel injury.³ Sebagai contoh, studi yang dilakukan oleh Nandipati dkk, menunjukkan bahwa sitokin proinflamator IL-6 mempunyai peran yang sangat penting dalam kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa.¹⁹ Di sisi lain IL-6 dengan kadar yang tinggi dalam ejakulat mempunyai korelasi positif dengan sel injury dan peroksidasi lipid membran spermatozoa.^{19,20} Studi lain juga menunjukkan bahwa peningkatan kadar IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF α mempunyai korelasi positif dengan peningkatan kadar ROS dan peroksidasi lipid membran spermatozoa.^{3,21}

Berbeda dengan sebagian besar sel soma yang mengandung banyak sitoplasma, sehingga mempunyai kapasitas antioksidan sitoplasma yang tinggi. Spermatozoa, mempunyai jumlah sitoplasma tidak banyak, sehingga kapasitas antioksidan sitoplasma juga rendah. Dikenal dua sistem buffer antioksidan dalam sitoplasma, yaitu enzymatic dan nonenzymatic antioxidant scavenger. Antioxidant enzymatic terdiri dari berbagai macam enzim seperti superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), dan glutathion peroxidase (GPX)/glutathion reductase (GRD). SOD, adalah enzim yang mengkatalisis perubahan dua molekul oksigen superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. CAT, adalah enzim yang terdapat pada peroksisom, mengkatalisis konversi hydrogen peroksida yang berasal dari hasil kerja SOD, menjadi oksigen dan air. GPX, enzim yang memerlukan selenium, mendegradasi hydrogen peroksida menjadi air.^{3,5,14} Senyawa yang termasuk dalam nonenzymatic antioksidan adalah glutathion, vitamin E, vitamin C, taurin, dan hipotaurin. Glutathion, merupakan senyawa nonenzymatic antioksidan yang sangat penting, adalah senyawa tripeptida yang terdiri dari glutamate, sistein, dan glisin. Subunit sistein mengandung gugus sulfhidril (SH) bebas yang secara langsung dapat menguraikan radikal bebas. Sekali glutathion teroksidasi (GSS), harus segera dikonversi kembali menjadi glutathion tereduksi (GSSH) oleh enzim GRD dan NADPH. Vitamin E adalah antioksidan yang sangat efektif untuk menangkap radikal bebas yang berada pada membrane sel, sedangkan vitamin C menangkap radikal bebas yang berada pada sitoplasma dari berbagai sumber. Vitamin C juga penting untuk mengkonversi radikal vitamin E menjadi vitamin E kembali.¹⁴ Mengingat spermatozoa secara constitutive merupakan sel yang mempunyai kapasitas sistem antioksidan sitoplasma rendah dan kandungan asam lemak tidak jenuh membran yang tinggi, oleh karena itu menjadi sangat rentan terhadap serangan ROS. Situasi tersebut diperberat oleh pembentukan ROS yang tinggi oleh spermatozoa immatur dan leukosit. Lebih lanjut, kondisi demikian

menyebabkan spermatozoa yang baik sekalipun dalam ejakulat sangat mungkin terkontaminasi oleh ROS dan mengalami stress oksidatif.⁵

ROS dan Fungsi Spermatozoa

Seperti diuraikan di atas bahwa, ROS adalah produk samping dari proses metabolisme aerobik dalam tubuh. ROS dalam batas fisiologis sangat diperlukan untuk signaling dalam rangka komunikasi antar sel. Komunikasi antar sel dalam konteks spermatozoa adalah fungsi spermatozoa yang meliputi kapasitas, hiperaktivasi, reaksi akrosom, dan fertilisasi. Aitken dkk melaporkan bahwa ROS dalam kadar fisiologis sangat diperlukan untuk fungsi normal spermatozoa.¹⁶ Lebih dari itu, spermatozoa bahkan, sangat membutuhkan produksi O[•] dalam jumlah yang sedikit untuk mendorong proses kapasitas dan reaksi akrosom.^{14,16} Eksistensi O[•] sangat diperlukan untuk mengubah fluiditas membran spermatozoa pada saat kapasitas dan fusi spermatozoa dengan oosit.¹⁴ Di sisi lain kadar O[•] yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sel akibat stres oksidatif.^{3,5} Apakah fungsi spermatozoa pada saat itu dapat berlangsung efektif atau tidak, sangat ditentukan oleh konsentrasi ROS dan ketersediaan antioksidan scavenger dalam ejakulat. Waktu paroh yang pendek dan difusi yang terbatas dari O[•] menunjukkan bahwa eksistensi ROS diatur dalam keseimbangan yang sempit antara ROS dengan antioksidan scavenger selama proses fisiologis berlangsung. Berapa total kapasitas antioksidan dalam ejakulat yang dapat menjamin fungsi spermatozoa berjalan optimal, atau paling tidak berhubungan dengan kualitas parameter sperma yang baik. Data yang dilaporkan oleh Das dkk memberi gambaran bahwa jumlah 0.075 – 1 x 10⁶ counted photon/menit/10 juta spermatozoa mempunyai korelasi dengan kualitas sperma yang baik.²² Selain itu, WHO juga melaporkan bahwa pria dengan astheozoospermia, asthenoteratozoospermia, dan oligoasthenoteratozoospermia mempunyai total kapasitas antioksidan lebih rendah secara bermakna dibanding pria dengan normozoospermia.²³ Fakta tersebut konsisten dengan studi yang dilakukan oleh Aitken, yang melaporkan bahwa lebih dari separo (55%) penderita dengan oligozoospermia yang menunjukkan kemampuan penetrasi sperma-oocyt lebih rendah dari 25% mempunyai kadar ROS tinggi.²⁴

Sumber ROS sebagaimana disebutkan di atas, dapat berasal dari leukosit (ekstrinsik) atau sel spermatozoa immature (intrinsik). Kedua sumber ROS tersebut, ketika dikomparasikan dengan parameter dan fungsi spermatozoa, ternyata mempunyai hubungan yang berbeda. ROS yang berasal dari sumber ekstrinsik lebih berhubungan dengan penurunan konsentrasi, motilitas, dan morfologi normal spermatozoa. Di sisi lain ROS yang berasal dari sumber intrinsik lebih berhubungan dengan fragmentasi DNA.³

Simpulan

Manusia sebagai organisme aerobik memerlukan oksigen untuk menjalankan metabolisme dan mempertahankan hidup. ROS merupakan produk samping dari metabolisme fosforilasi oksidatif yang berlangsung dalam mitochondria. ROS dalam kadar rendah sangat diperlukan untuk komunikasi antar sel, namun dalam kadar yang tinggi dapat merusak sel. Sel yang rusak akibat serangan ROS dikenal dengan stres oksidatif. Kerusakan sel terutama pada sel posmitotik seperti saraf, endokrin, dan imunitas menyebabkan orang akan mengalami gangguan homeostasis, kemudian penuaan. Orang muda atau sehat mampu mengatur homeostasis secara baik, sedangkan orang tua gagal untuk mengatur homeostasis.

ROS, selain diproduksi oleh sel soma, juga dapat diproduksi oleh spermatozoa dan ejakulat. Sumber ROS dalam ejakulat terutama berasal dari sel spermatozoa immature dan

neutrofil yang aktif. Spermatozoa lebih mudah terserang ROS, selain karena kapasitas antioksidan sitoplasma rendah, juga mengandung asam lemak tidak jenuh ganda tinggi. Kerusakan spermatozoa akibat serangan ROS selain menyebabkan konsentrasi, motilitas, dan morfologi normal menurun, juga menyebabkan kehilangan fungsi spermatozoa seperti hiperaktivasi, capacitasi, reaksi akrosom dan fusi spermatozoa dengan oosit.

Untuk mencegah kerusakan akibat ROS, tubuh menyediakan system antioksidan scavenger, baik enzymatic maupun nonenzymatic.

Kepustakaan:

1. Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; 18 (6), 761-768
2. Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and Tissue Research* 2005; 322, 33–41
3. Kefer JC, Agrawal A, Sabanegh E. role of antioxidant in the treatment of male infertility. *International journal of Urology* 2009; 16, 449 – 57
4. De la Fuente M, Miquel J. An Update of the Oxidation-Inflammation Theory of Aging: The Involvement of the Immune System in Oxi-Inflamm-Aging. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15, 3003-3026 3
5. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129: 357 – 67
6. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history 1954–2009, 2009; *Biogerontology* 10, 773–781
7. Ladiges W, Wanagat J, Preston B, Loeb L, Rabinovitch P. A Mitochondrial view of aging, reactive oxygen species and metastatic cancer. *Aging Cell* 2010; 9,462–465
8. Guyton & Hall. Volume Paru. In: fisiologi Kedokteran. Ed 9th penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta 1996; 604
9. Cataldi A. Cell Responses to Oxidative Stressors. *Current Pharmaceutical Design* 2010; 16, 1387-1395
10. Wojcik M, Pedziwiatr IB, Wozniak LA. A Review of Natural and Synthetic Antioxidants Important for Health and Longevity. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17, 3262-3288
11. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **2007**; 39, 44-84.
12. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C.J, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* **2004**; 266, 37-56.
13. Devlin TM. Reactive Oxygen Species (ROS). In: Devlin TM *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation* Ed.5th Willey-List New York 2002; 590 – 91
14. Lanzame F. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; 19, 5: 638 - 59
15. Nieschlag E. Physiology of Sperm Maturation and Fertilization: Seminal Plasma. In: Nieschlag E, Behre HM, Eds. *Andrology, Male Reproductive Health and dysfunction*. Berlin Hiedelberg; Spinger-Verlag 1997; 65.
16. Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *BioEssays* 1994; 16, 259–267.
17. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*; 1992 57, 409 – 416.
18. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 77, 276 - 87.

19. Nandipati KC, Pasqualotto FF, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in vasectomy reversal patients. *Andrologia* 2005; **37**, 131– 4.
20. Martinez P, Proverbio F, Camejo MI. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. *Asian J. Androl.* 2007; **9**, 102–7.
21. Sanocka D, Jedzejczak P, Szumala-Kaekol A, Fraczek M, Kurpisz M. Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J. Androl* 2003; **24**, 448 – 55.
22. Das S, Chattopadhyay R, Jana SK et al. Cut-off value of reactive oxygen species for predicting semen quality and fertilization outcome. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2008; 54, 47–54.
23. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction (4th edition). Cambridge University Press, Cambridge UK 1999.
24. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB et al. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology* 1989; 10, 214–220.