

PENGARUH *ESCHERICHIA COLI* DAN GRANULOSIT TERHADAP KADAR REACTIVE OXYGEN SPECIES SECARA IN VITRO

Sukarjati¹, Doddy M Soebadi², Aucky Hinting³, dan Sudjarwo⁴

¹ Biologi, FMIPA Univ. PGRI Adi Buana Surabaya

² Dep. Urologi, Fak. Kedokteran Univ. Airlangga Surabaya

³ Dep. Biomedik, Fak. Kedokteran Univ. Airlangga Surabaya

⁴ Dep. Kimia Farmasi, Fak. Farmasi Univ. Airlangga Surabaya

ABSTRACT

In humans, male genital tract infection has been recognized as one of the causes of infertility. Indicators of the occurrence of genital tract infection are the presence of bacteria during semen culture (bacteriospermia) and the finding of leucocyte of more than 1 million/ml semen (leucocytospermia). *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most common cause of prostatitis and epididymitis. The objective of this study was to determine the effects of *E. coli* and granulocytes on Reactive Oxygen Species (ROS) level in vitro. This study comprised of two experiments. In the experiment 1, sperm was incubated with *E. coli*, and the experiment 2, the sperm was incubated with granulocyte. In those experiments, ROS levels were observed. Spermatozoa were obtained from donor with normal spermatozoa according to WHO (1999). *Escherichia coli* was obtained by culturing the semen of infertile males. Granulocytes were obtained from donors' blood. Sperm preparation was made by using Percoll gradient column method. Granulocyte isolation used Histopaque 1077 and 1119. ROS level was detected by means of chemiluminescence method with beta counter device. The result of this study showed that in vitro *E. coli* had the effect on ROS level, both stimulated by peroxidase ($p = 0.000$) and PMA ($p = 0.006$). Granulocyte had effect on ROS level. In peroxidase-stimulated ROS level, there was the effect between spermatozoa and granulocyte-incubated sperm ($p = 0.000$), granulocyte-incubated sperm and granulocyte ($p = 0.002$), and sperm and granulocyte ($p = 0.000$). In PMA-stimulated ROS level, there was effect between sperm and granulocyte-incubated sperm ($p = 0.000$), sperm and granulocyte ($p = 0.000$), granulocyte-incubated sperm and granulocyte ($p = 0.000$). In conclusion, under in vitro experiment, sperm incubated with *E. coli* and sperm incubated with granulocyte had the effect on the level of the ROS.

Key words: *Escherichia coli*, granulocyte, spermatozoa, ROS

PENGANTAR

Menurut Sikka *et al.* (2001) 30–50% kasus infertilitas disebabkan oleh pihak pria. Penyebab infertilitas pria telah diidentifikasi, yaitu mutasi gen, aneuploid, varikokel, radiasi, kemoterapi, gangguan ereksi, oklusi duktus ejakulatorius, dan infeksi (Ollero *et al.*, 2001). Menurut Khanna *et al.* (1992) infeksi traktus genitalis pria merupakan penyebab infertilitas sebesar 10%. Hasil penelitian Hinting (2006) menunjukkan bahwa dari 1032 pria infertil, insiden infeksi kelenjar seks aksesori pria sebesar 13,4%. Prevalensi infeksi kelenjar seks aksesori pada pasien dengan *mixed antiglobulin reaction* (MAR) positif sekitar 20% (Hinting *et al.*, 1996).

Infeksi traktus genitalis pria dapat menyebabkan infertil karena mikroorganisme yang menginfeksi traktus genitalis dapat memengaruhi fertilitas baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung, yaitu dengan perlekatan bakteri ke spermatozoa atau toksin yang dihasilkan oleh bakteri (Wolff *et al.*, 1993). Secara tidak langsung bahwa infeksi dapat menyebabkan obstruksi atau lesi nondestruktif pada duktus ekskretori dan lesi pada kelenjar seks aksesori

(Auroux *et al.*, 1991). Infeksi traktus genitalis juga dapat merusak *blood testis barrier* yang mengakibatkan kebocoran leukosit dalam tubulus seminiferus atau epididimis (Alvarez *et al.*, 2002).

Indikator bahwa telah terjadi infeksi traktus genitalis adalah adanya bakteri saat dilakukan kultur semen (bakteriospermia) dan ditemukannya leukosit dengan jumlah lebih dari 1 juta/ml semen (leukositospermia) (Fraczek *et al.*, 2004). Konsentrasi bakteri $\geq 10^3$ colony forming unit (cfu)/ml patogen traktus urinarius di dalam ejakulat ditetapkan sebagai bakteriospermia (Weidner *et al.*, 1999). Hasil penelitian Golshani *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa *E. coli* dan *Entrococci* berdampak negatif terhadap motilitas dan morfologi spermatozoa. *E. coli* merupakan penyebab utama prostatitis dan epididimitis (Liu *et al.*, 2002).

Leukosit ada di testis pada saat terjadi sirkulasi monosit mencapai gonad selama kehidupan fetus. Bertambahnya konsentrasi leukosit dalam semen merupakan indikator infeksi traktus genitalis (Alvarez *et al.*, 2002). Insiden leukositospermia berkisar 10–20% pada pria infertil, dan

Polymorphonuclear neutrophil (PMN) serta makrofag adalah komponen utama leukosit seminal plasma (Agarwal *et al.*, 2003). Leukosit yang mengkontaminasi semen dapat secara potensial merusak spermatozoa melalui substansi toksik seperti ROS yang berkaitan dengan fagositosis. Leukosit telah diidentifikasi menjadi penghasil utama ROS dalam semen dan sebagai sumber penting kerusakan oksidatif ke spermatozoa yang mana merupakan faktor kunci sebagai penyebab infertilitas pria (Fraczek *et al.*, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dampak *E. coli* dan granulosit terhadap kadar ROS secara *in vitro*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan penelitian ini adalah *E. coli* isolat semen pria infertil, granulosit dari darah donor dan spermatozoa normal menurut kriteria WHO (1999). Besar sampel yang digunakan adalah pada inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* digunakan 9 sampel, inkubasi spermatozoa dengan granulosit digunakan 16 sampel.

Cara Kerja

Penelitian ini terdiri atas 2 eksperimen. Eksperimen 1 untuk mengetahui pengaruh inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* terhadap kadar ROS. Eksperimen 2 untuk mengetahui pengaruh inkubasi spermatozoa dengan granulosit terhadap kadar ROS.

Eksperimen 1

Persiapan *E. coli*

Identifikasi bakteri yang dilakukan terbatas untuk deteksi dan identifikasi *E. coli*. Satu tetes semen yang telah diencerkan 1:1 diratakan dengan cara goresan metode standar bakteriologis pada agar darah, kemudian diinkubasi pada 37° C selama 24 jam. Setelah ada pertumbuhan koloni bakteri biakan dipindah pada medium Mac Conkey dan EMB dan di inkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram. Kemudian dilakukan uji fisiologi atau biokimia. Stok *E. coli* ditanam pada Nutrient Agar selama 24 jam 37° C. Kemudian diinokulasi pada media earle's. Selanjutnya dibuat suspensi bakteri dalam media earle's sesuai dengan standar Mac Farland (Standar Mac Farland terendah yang setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ /ml) menggunakan spektrofotometer. Bila sudah sesuai dengan standar Mac Farland, diencerkan sesuai dengan konsentrasi spermatozoa hasil preparasi menggunakan kolom bertingkat Percoll (*Sil Select Plus*).

Persiapan spermatozoa

Spermatozoa berasal dari ejakulat pria yang mempunyai spermatozoa normal menurut kriteria WHO (1999). Semen diperoleh dengan cara masturbasi dan ditampung ke dalam botol kaca atau plastik steril yang bermulut lebar setelah abstinencia sedikitnya 2 hari dan tidak lebih lama dari 7 hari. Setelah liquifaksi dilakukan analisa spermatozoa menurut kriteria WHO (1999). Kriteria spermatozoa normal menurut WHO (1999) adalah volume 2 ml atau lebih, pH 7,2–7,8, konsentrasi sperma: 20 juta spermatozoa/ml atau lebih, total jumlah sperma: 40 juta sperma/ejakulat atau lebih, motilitas: 50% atau lebih kategori a + b atau 25% atau lebih kategori a, morfologi: 15% atau lebih mempunyai morfologi normal, vitalitas: 75% atau lebih hidup, sel darah putih: kurang dari 1 juta/ml. Selanjutnya dilakukan preparasi spermatozoa menggunakan metode kolom bertingkat Percoll (*Sil Select Plus*). Adapun metode preparasi spermatozoa menggunakan kolom bertingkat Percoll adalah sebagai berikut: sebanyak 1,5 ml semen diletakkan di atas lapisan Percoll 2 lapis (Percoll 45% di bagian atas dan 90% di bagian bawah) dalam tabung sentrifus. Dilakukan pemusingan selama 10 menit pada 300–400g. Kemudian supernatan dibuang sampai dekat dengan endapan. Ditambahkan 2 ml media earle's dan dilakukan pencampuran kemudian dilakukan pemusingan selama 10 menit pada 300–400 g dan supernatan dibuang. Di atas endapan secara hati hati ditambahkan 1 ml media earle's. Spermatozoa hasil preparasi ini kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan hemositometer Neubaur.

Perlakuan Spermatozoa dengan *E. coli*

Spermatozoa hasil Percoll dibagi 2 kelompok (A dan B). Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut: (A) Spermatozoa diinokulasi dengan *E. coli* dan (B) Spermatozoa sebagai kontrol.

Inkubasi spermatozoa-bakteri dilakukan dalam *microtube* Eppendorf 1,5 ml dengan rasio sperma/*E. coli* = 1:1. Inkubasi dilakukan selama 3 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap kadar ROS.

Penentuan Kadar ROS

Pengamatan kadar ROS menggunakan metode khemiluminisence dengan alat *beta counter*. Kadar ROS dihitung dalam Log cpm/jt sperma.

Pada setiap kelompok dibagi 2 bagian. Pada tiap bagian dilakukan pengamatan terhadap kadar ROS dengan perlakuan sebagai berikut: A1 dan B1: Distimulasi dengan

horseradish peroxide; A2 dan B2: Distimulasi dengan PMA (phorbol-12-miristat-13-asetat).

Prosedur pengamatan A1 dan B1 adalah sperma yang akan diperiksa (0,4 ml) ditambah 8,5 µl luminol (25 mM dalam DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) dengan konsentrasi akhir 250 µM), 12 µl *horseradish peroxide* (2 mg/ml PBS), dan 29,5 µl media Earle's (Sudjarwo, 2001). Khemiluminisensi diamati pada 1 menit, 3 menit, dan 5 menit. Prosedur pengamatan A2 dan B2 adalah sperma yang akan diperiksa (0,4 ml) ditambah 8,5 µl luminol (25 mM dalam DMSO, (*Dimethyl Sulfoxide*) dengan konsentrasi akhir 250 µM), 12 µl *horseradish peroxide* (2mg/ml PBS) dan 3 µl PMA 1 mM dalam DMSO) dan 27 µl media Earle's (Sudjarwo, 2001). Pengamatan dilakukan pada 1 menit, 3 menit, 5 menit, 7 menit, 10 menit, 12 menit, dan 15 menit.

Eksperimen 2

Isolasi granulosit

Granulosit disiapkan menggunakan *histopaque 1077* dan 1119 (*Sigma Aldrich*). 10 ml darah dimasukkan tabung steril disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar kemudian diaduk dan disentrifus lagi pada 1500 rpm selama 5 menit kemudian serum dibuang. Tabung sentrifus steril dengan hati hati diisi dengan *histopaque 1119* sebanyak 3 ml. Kemudian dengan hati-hati ditambahkan *histopaque 1077* sebanyak 3 ml. Sebanyak 6 ml darah yang sudah dibuang serumnya ditambahkan dengan cara mengalirkan melalui dinding tabung. Kemudian disentrifus pada 700 g selama 30 menit. Hasilnya akan tampak lapisan-lapisan pada tabung sentrifus, yaitu mulai dari atas ke bawah sebagai berikut: lapisan plasma, lapisan *mononuclear cell*, lapisan *histopaque 1077*, lapisan granulosit, lapisan *histopaque 1119* dan yang terbawah lapisan erithrosit. Sebanyak 3 lapisan teratas dibuang, dan dengan hati-hati lapisan granulosit dipipet dan ditampung pada tabung lain. Pada tabung yang berisi granulosit ditambahkan 10 ml PBS

steril dan disentrifus pada 200g selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambah 10 ml PBS steril dan disentrifus 200g selama 10 menit. Proses pencucian ini diulang sekali lagi. Selanjutnya 0,5 ml pelet yang berisi granulosit ini diresuspensi dengan 0,5 ml medium Earle's. Kemudian dihitung konsentrasi sel menggunakan Haemocytometer Neuber, dan diamati viabilitas selnya.

Perlakuan spermatozoa dengan granulosit

Spermatozoa hasil Percoll dibagi 2 kelompok, granulosit hasil isolasi dibagi 2 kelompok, selanjutnya diperlakukan sebagai berikut: (A) Spermatozoa tanpa granulosit; (B) Spermatozoa di inkubasi dengan granulosit; (C) Granulosit

Inkubasi dilakukan di *microtube* Eppendorf 1,5 ml selama 3 jam pada suhu ruang. Selanjutnya diamati kadar ROS baik yang distimulasi dengan *horseradish peroxide* maupun dengan PMA. Kadar ROS dihitung dalam Log cpm/jt sperma, Log cpm/jt sperma/jt granulosit dan Log cpm/jt granulosit. Prosedur preparasi sperma dan penentuan kadar ROS sama seperti pada eksperimen 1.

Analisis Data

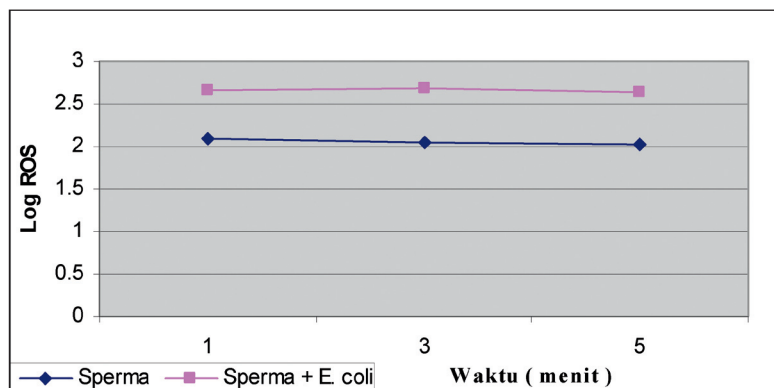
Pengaruh inkubasi sperma dengan *E. coli*, dan sperma dengan granulosit terhadap kadar ROS data dianalisis dengan uji F bila hasilnya bermakna dilanjutkan dengan uji LDS.

HASIL

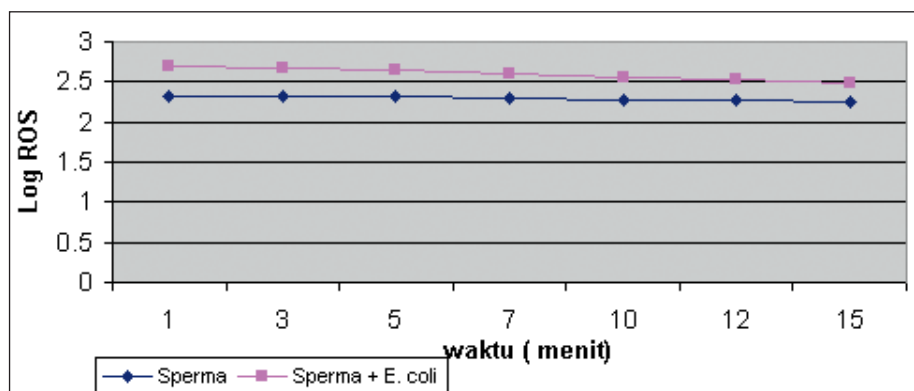
Eksperimen 1

Pengaruh inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* terhadap kadar ROS.

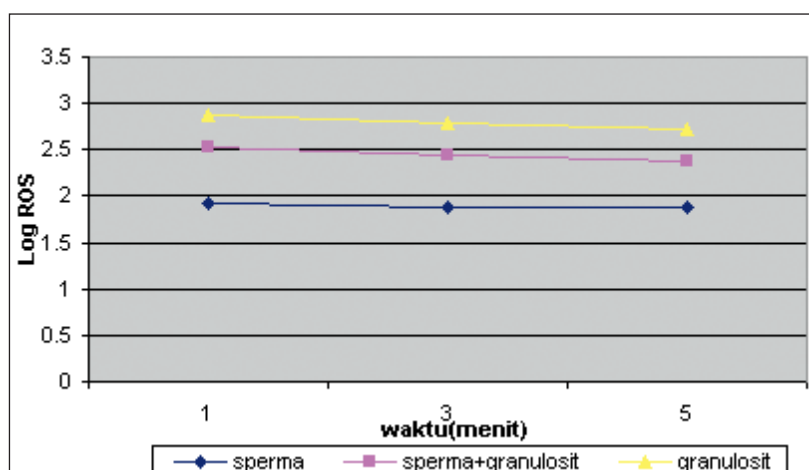
Data kadar ROS yang distimulasi peroksidase pada sperma dan sperma yang diinkubasi dengan *E. coli* disajikan dalam Gambar 1. Tampak pada gambar bahwa kadar ROS



Gambar 1. Kadar ROS yang distimulasi peroksidase pada inkubasi sperma dengan *E. coli*.



Gambar 2. Kadar ROS yang distimulasi PMA pada inkubasi sperma dengan *E. coli*



Gambar 3. Kadar ROS yang distimulasi Peroksidase pada inkubasi sperma dengan Granulosit

yang distimulasi peroksidase, pada setiap waktu pengamatan kadar ROS spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli* lebih tinggi daripada kadar ROS spermatozoa.

Pengaruh inkubasi sperma dengan *E. coli* terhadap kadar ROS yang distimulasi dengan PMA seperti pada Gambar 2.

Tampak pada Gambar 2 kadar ROS yang distimulasi PMA, pada setiap waktu pengamatan spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli* mempunyai kadar ROS yang lebih tinggi daripada spermatozoa. Dilakukan uji F untuk membuktikan pengaruh inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* terhadap kadar ROS.

Pada Gambar 1, kadar ROS yang distimulasi peroksidase, tidak terjadi pengaruh pada interaksi perlakuan dan waktu ($p = 0,976$). Pada antarwaktu juga tidak terjadi pengaruh ($p = 0,952$). Pada antarperlakuan terjadi pengaruh ($p = 0,000$). Pengaruh terjadi pada kadar ROS yang distimulasi peroksidase antara spermatozoa dengan spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli*.

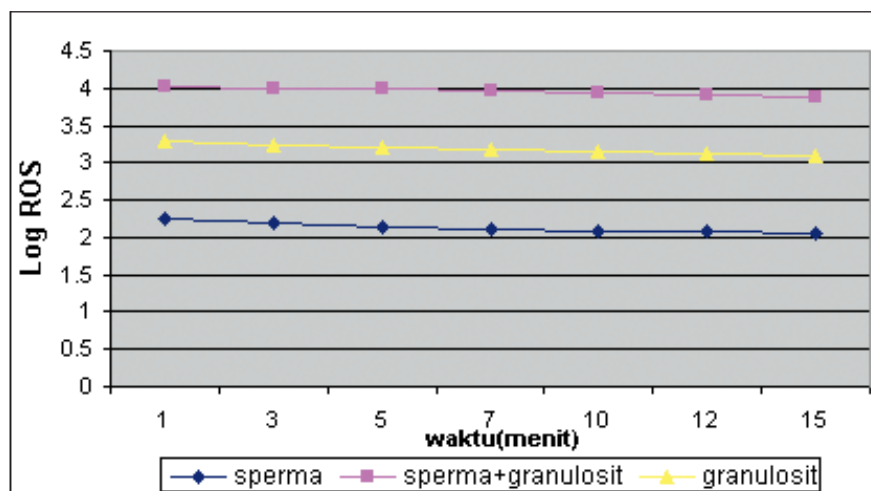
Pada Gambar 2, kadar ROS yang distimulasi PMA, tidak terjadi pengaruh pada interaksi perlakuan dan waktu ($p = 1,000$). Pada antarwaktu tidak terjadi pengaruh ($p = 0,989$). Pada antarperlakuan terjadi pengaruh ($p = 0,006$). Dengan demikian terjadi pengaruh kadar ROS yang distimulasi PMA antara spermatozoa dengan spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli*.

Eksperimen 2

Pengaruh inkubasi sperma dengan granulosit terhadap kadar ROS

Berikut ini adalah data kadar ROS pada perlakuan sperma dengan granulosit yang disajikan pada Gambar 3.

Pada Gambar 3 tampak bahwa kadar ROS yang distimulasi peroksidase, inkubasi sperma dengan granulosit pada setiap waktu pengamatan lebih tinggi daripada kadar ROS sperma, dan kadar ROS granulosit pada setiap waktu pengamatan lebih tinggi daripada kadar ROS sperma dan kadar ROS sperma yang diinkubasi dengan granulosit.



Gambar 4. Kadar ROS yang distimulasi PMA pada inkubasi sperma dengan Granulosit

Pada Gambar 4 tampak bahwa kadar ROS yang distimulasi PMA, kadar ROS pada inkubasi sperma dengan granulosit pada setiap waktu pengamatan lebih tinggi daripada kadar ROS sperma dan kadar ROS granulosit.

Hasil analisis data menunjukkan kadar ROS yang distimulasi peroksidase, antar waktu tidak terjadi pengaruh ($p = 0,607$), interaksi antara waktu dan perlakuan tidak terjadi pengaruh ($p = 0,993$), antarperlakuan ada pengaruh ($p = 0,000$). Antar perlakuan tersebut terjadi pengaruh antara sperma dan sperma yang diinkubasi dengan granulosit ($p = 0,000$), sperma yang diinkubasi dengan granulosit dan granulosit ($p = 0,002$), antara sperma dengan granulosit ($p = 0,000$).

Kadar ROS yang distimulasi PMA, antarwaktu tidak ada pengaruh ($p = 0,942$), interaksi antara waktu dan perlakuan tidak ada pengaruh ($p = 1,000$), antarperlakuan ada pengaruh ($p = 0,000$). Pengaruh tersebut terjadi pada sperma dan sperma yang diinkubasi dengan granulosit ($p = 0,000$), sperma dengan granulosit ($p = 0,000$), sperma yang diinkubasi dengan granulosit dan granulosit ($p = 0,000$).

PEMBAHASAN

Pengaruh *E. coli* terhadap Kadar ROS

Spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli* berpengaruh terhadap kadar ROS baik yang distimulasi peroksidase maupun PMA. Tingginya kadar ROS tersebut disebabkan *E. coli* selama inkubasi terjadi pertumbuhan. *E. coli* memberi kontribusi terhadap kadar ROS. Hal ini sesuai hasil studi pada *E. coli* yang menunjukkan bahwa enzim sitosol dapat menghasilkan O_2^- , dan proporsi terbesar O_2^- datang dari rantai transpor elektron (Halliwell dan

Gutteridge, 1999). Mekanisme patologi bakteri melalui dihasilkannya ROS yang menyebabkan fungsi spermatozoa berubah belum diketahui. Diperkirakan bakteri memerantari merusak fungsi sperma melalui mekanisme *oxidative burst* (Ochsendorf, 1999).

Toksin yang dikeluarkan *E. coli* dan trauma fisik akibat perlekatan *E. coli* ke spermatozoa mengakibatkan terjadinya *oxidative stress*. *Oxidative stress* tersebut disebabkan trauma fisik dan toksin mengakibatkan dikeluarkannya *Arachidonic acid*, pembentukan enzim peroksidase oleh aktivasi enzim lipoxigenase dan siklooksigenase. Dekomposisi peroksida menjadi radikal peroksil/alkoksil yang terbentuk secara enzimatis atau non enzimatis dapat menimbulkan kerusakan yang luas ke lipid atau protein lain. Dilepaskannya ion Fe^{2+} dan Cu^{2+} menstimulasi pengubahan H_2O_2 menjadi OH^- . Ca^{2+} intraseluler menjadi meningkat. Peningkatan Ca^{2+} intraseluler menstimulasi Calpain, Ca^{2+} dependent nuklease dan Ca^{2+} Calmodulin dependent nitrit oksida sintase, menghasilkan NO^- berlebih dan menambah risiko pembentukan $ONOO^-$. Terjadi kerusakan mitokondria yang mengakibatkan kebocoran elektron bertambah untuk membentuk O_2^- (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Serangkaian proses tersebut di atas dapat menyebabkan kadar ROS meningkat.

Studi terdahulu yang menghubungkan ROS dengan infeksi di antaranya adalah penelitian yang dilaporkan oleh Pott *et al.* (2000) bahwa pasien yang terinfeksi *Ureaplasma urealyticum* mempunyai kadar ROS yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak terinfeksi. *Rickettsia rickettsii* menyebabkan bertambahnya produksi ROS intraseluler dalam 5 jam. Oksidan utama yang dihasilkan adalah hidrogen peroksida dan manifestasinya adalah kerusakan sel, dan tingginya radikal superoksida anion pada

pasien dengan kultur positif bakteri aerob dibanding kontrol fertil (Ochsendorf, 1999).

Pengaruh Granulosit terhadap Kadar ROS

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ada pengaruh granulosit terhadap kadar ROS yang distimulasi peroksidase dan PMA. Kadar ROS yang distimulasi PMA lebih tinggi daripada kadar ROS yang distimulasi Peroksidase baik pada spermatozoa, spermatozoa yang diinkubasi dengan granulosit maupun pada granulosit.

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

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

Spermatozoa normal dari manusia tidak dapat merespons stimulasi PMA dengan mempertinggi produksi O_2^- , hanya spermatozoa defek yang dapat merespon PMA. Ketidakmampuan PMA untuk mengaktifkan NADPH oksidase pada spermatozoa bukan karena kurangnya aktivitas protein kinase C (PKC) dalam sel ini (Vernet *et al.*, 2001). Sampai sekarang, faktor yang tampak mampu mengaktifkan kompleks enzim ini dalam spermatozoa adalah substrat dalam bentuk NADPH. Dalam hal ini sperm oksidase tidak seperti enzim lekosit yang harus diaktivasi sebelum ia dapat menghasilkan O_2^- . Kurang diperlukannya aktivasi oksidase mungkin menjelaskan mengapa PMA tidak efektif dalam menstimulasi produksi O_2^- . Perbedaan antara sperma oksidase dan leukosit oksidase berkenaan dengan kebutuhan mereka untuk aktivasi mungkin mencerminkan

perbedaan yang fundamental dalam struktur dan fungsi dari tipe sel yang berbeda. Pada leukosit, mekanisme aktivasi ditentukan oleh oksidase pada tingkat untuk memastikan bahwa O_2^- tidak secara konstan dihasilkan oleh leukosit tetapi hanya dihasilkan selama *oxidative burst* ketika fagosit diaktivasi oleh rangsangan yang tepat seperti sel asing atau mikroorganisma. Sebaliknya spermatozoa terus menerus memerlukan dihasilkannya ROS dalam tingkat untuk menstimulasi signal transduksi *redox-regulated* untuk kapasitas. Selain itu kurangnya sitoplasma dalam spermatozoa dan memerlukan persaingan NADPH sitoplasma untuk pembakaran *glutathion cycle* dimaksudkan bahwa di bawah kondisi normal, oksidase hanya akan berjalan pada substrat yang cukup untuk memelihara aktivitas tingkat rendah yang konstan yang diperlukan untuk mendukung kapasitas. Jika ruang sitoplasma bertambah, yang dikarakteristikan pada sperma dengan sisa sitoplasma (*sitoplasmic droplet*), substrat yang tersedia berlimpah dan O_2^- dihasilkan dalam jumlah besar maka dapat menginduksi kerusakan peroksidatif (Vernet *et al.*, 2001). Uraian tersebut di atas dapat menjelaskan bahwa pada penelitian ini inkubasi spermatozoa dengan granulosit mempunyai kadar ROS yang lebih tinggi daripada granulosit dan sperma. Kadar ROS pada inkubasi spermatozoa dengan granulosit lebih tinggi daripada granulosit, hal ini sesuai dengan pernyataan Agarwal *et al.*, (2003) yaitu granulosit yang aktif dapat menghasilkan 100 kali lebih tinggi ROS daripada leukosit yang tidak aktif. Kadar ROS granulosit lebih besar daripada spermatozoa. Hal ini sesuai dengan WHO (1999) yang menyatakan bahwa leukosit dapat menghasilkan ROS 100 kali lebih besar dibanding dengan spermatozoa.

Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa kadar ROS yang tinggi pada inkubasi sperma dan *E. coli* melalui mekanisme adanya trauma fisik akibat perlekatan *E. coli* ke spermatozoa. Kadar ROS yang tinggi pada inkubasi sperma dengan granulosit akibat terjadinya *respiratory burst* akibat terjadinya fagositosis.

KEPUSTAKAAN

- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA, 2003. Role of Reactive Oxygen Species in The pathophysiology of Human Reproduction, *Fertil Steril*, 79: 829–43
- Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Evenson DP, Argawal A, 2002, Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatine structure assay, *Fertil Steril*, 78: 319–29.
- Armstrong JS, Bivalacqua TJ, Chamulitrat W, Sikka S, Hellstrom WJG, 2002. A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells, *Int. J. Androl.*, 25: 223–9

- Auroux MR, Jacquest L, Mathieu D, Aurer J, 1991. Is The Sperm Bacterial ratio a Determining Factor in Impairment of Sperm Motility: An *In Vitro* Study in Man With *E. coli*, *Int. J. Androl.*, 14: 264–70.
- Fraczek M, Sanocka D, and Kurpisz M, 2004. Interaction between Leucocytes and Human Spermatozoa Influencing Reactive Oxygen Intermediates Release, *Int. J. Androl.*, 27: 69–75.
- Gil-Guzman E, Ollero, Lopez, Sharma RK, Alvarez, Thomas Jr, agarwal A, 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation, *Human Reproduc.*, 16: 1922–30.
- Golshani M, Taheri S, Eslami G, Suleimani Rahbar AA, Fallah F, Goudarzi H, 2006. Genital Tract Infection in Asymptomatic Infertile Men and Its Effect on Semen Quality, *Iranian J Publ. Health*, 35: 81–4
- Halliwell B and Gutteridge JMC, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Ed, Oxford University Press.
- Hinting A, 2006. Standarized management of male infertility, Post Graduate course of Andrology I: Comprehensive Management of male infertility, Surabaya, 6–8 April 2006.
- Hinting A, Soebadi DM, and Santoso RI, 1996. Evaluation of the immunological cause of infertility, *Andrologia*, 28: 123–6.
- Khanna J, Van Look PFA, Griffin PD, 1992. A Key to Brihter Future, Geneva, Word Health Organization.
- Liu Jh, Li HY, Cao SG, Duan YF, Li Y, 2002. Influence of Several Urophatogenic Microorganism on Human Sperm Motilityin Vitro, *Asian J. Androl.*, 4: 179–82.
- Ochsendorf FR, 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species, *Human Reproduc.*, *Update*, 5: 399–420.
- Ollero M, Guzman EG, Lopez MC, Sharma RK, Argarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas Jr AJ, Alvarez JG, 2001. Characterization of subset of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility, *Human Reproduc.*, 16: 1912–21.
- Pott JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A, 2000. Association of *Ureaplasma urealitycum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia, *J Urol*, 163: 1775–8.
- Sikka SC, Champion HC, Bivalacqua TJ, Estrada LS, Wang R, Rajasekaran M, Agarwal BT, and Hellstrom WJG, 2001. Role of genitourinary inflammation in infertility: synergistic effect of lipopolysaccharide and interferon γ on human spermatozoa, *Int. J. Androl.*, 24: 136–41.
- Sudjarwo, 2001. *Peran Mitokondria pada Fungsi Spermatozoa*, Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Vernet P, Fulton N, Wallace C, Aitken RJ, 2001. Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa, *Biol. Reproduc.*, 65: 1102–13.
- Weidner W, Krause W, and Ludwig M, 1999. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis, *Human Reproduc. Update*, 5: 421–32.
- Wolff H, Panhans A, Stolz W, Mauree M, 1993. Adherence of *E. coli* to Sperm: A Mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*, *Fertil Steril*, 60: 154–8.
- Word Health Organization, 1999. WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.

Reviewer: **Prof. Wasito, Ph.D, drh**