

PENGARUH LIKOPEN TERHADAP KUALITAS DAN KADAR MALONDIALDEHID SPERMATOZOA YANG DIPAJANKAN PADA ZALIR PERITONEUM WANITA DENGAN ENDOMETRIOSIS

*Effect of Lycopene on the Quality and
Malondialdehyde Levels of Spermatozoa
Incubated in the Peritoneal Fluid of Women with Endometriosis*

Nanang W. Astarto
Universitas Padjadjaran
email korespondensi: publikasi@pasca.unpad.ac.id

Abstrak

Kualitas spermatozoa harus optimal agar dapat bertahan pada lingkungan zalir peritoneum, tuba dan uterus, khususnya pada wanita dengan endometriosis yang zalir peritoneumnya mengandung oksidan dan zat proinflamasi yang dapat merusak sperma. Likopen merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Metode inkubasi likopen pada rangkaian preparasi spermatozoa menjanjikan penerapan metode baru untuk dapat menghasilkan spermatozoa yang lebih tahan terhadap faktor stres oksidatif dan inflamasi yang ada di dalam zalir peritoneum, tuba dan rongga uterus khususnya pada wanita dengan endometriosis. Penelitian ini dimaksudkan untuk menguji manfaat penambahan likopen pada preparasi spermatozoa dalam melindungi viabilitas, motilitas, morfologi, fragmentasi DNA, dan kadar MDA dari pengaruh zat oksidatif dan inflamasi zalir peritoneum wanita dengan endometriosis agar kualitas spermatozoa tetap terjaga dengan baik pada program inseminasi intrauterin. Tujuan penelitian ini adalah menguji pengaruh inkubasi likopen pada preparasi spermatozoa terhadap viabilitas, motilitas, morfologi, fragmentasi DNA dan kadar MDA spermatozoa yang terpajan zalir peritoneum wanita dengan endometriosis. Penelitian ini menggunakan metode kajian intervensional/eksperimental dasar yang dilakukan di laboratorium (in vitro) dengan spermatozoa sebagai subjek penelitian. Penelitian dilakukan di Klinik Aster, RSUP Dr. Hasan Sadikin/Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung sejak Maret sampai dengan November 2013. Lima belas sampel spermatozoa dipreparasi dan diberi perlakuan dengan tiga metoda yang berbeda. Kelompok perlakuan yang pertama adalah spermatozoa yang direndam dengan 5µM likopen selama 30 menit kemudian diberi zalir peritoneum endometriosis. Kelompok perlakuan kedua adalah spermatozoa yang diberi zalir peritoneum endometriosis. Sedangkan kelompok ketiga adalah spermatozoa yang diberi sperm wash medium. Pemeriksaan viabilitas, motilitas, morfologi, fragmentasi DNA menggunakan metoda SCA, sedangkan kadar MDA menggunakan metode kolorimetrik. Analisis dilakukan pada empat waktu, jam ke-0, -3, -6, dan -24 jam. Pada penelitian ini didapatkan viabilitas spermatozoa yang diinkubasi dalam zalir peritoneum wanita dengan endometriosis yang diberi perlakuan likopen lebih tinggi dibandingkan tanpa likopen. Tidak terdapat perbedaan motilitas antara kelompok perlakuan satu dan dua. Morfologi spermatozoa pada kelompok satu dipertahankan lebih baik dibandingkan kelompok dua dan tiga. Tidak terdapat perbedaan fragmentasi DNA antara semua kelompok perlakuan. Tingkat kadar MDA spermatozoa pada kelompok satu lebih rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya. Disimpulkan bahwa penggunaan likopen dalam preparasi sperma terbukti dapat mempertahankan kualitas spermatozoa, terutama viabilitas dan morfologinya, juga dapat menekan kadar MDA.

Kata kunci: endometriosis, fragmentasi DNA, likopen, malondialdehid, morfologi, motilitas, spermatozoa, viabilitas

Abstract

The quality of spermatozoa should be optimized in order to survive in the peritoneal fluid environment, tubes and uterus, especially in women with endometriosis in which its peritoneal fluid containing oxidant and pro-inflammatory substances that can damage the sperm. Lycopene is a compound that has a high antioxidant activity. Method of lycopene in a series of incubation of sperm preparation ensure an application of new methods that can produce spermatozoa that are more resistant to oxidative stress and inflammatory factors that exist in the peritoneal fluid, tubal and uterine cavity, especially in women with endometriosis. This study aimed to examine the benefits of the addition of lycopene in preparation in protecting sperm's morphology, motility, viability, DNA fragmentation and level of MDA as the result of oxidative and inflammatory peritoneal fluid of women with endometriosis so that sperm quality is maintained properly in intrauterine insemination program. The purpose of this study was to test the effect of incubation of lycopene on the motility of spermatozoa preparation, viability, DNA fragmentation and level of MDA of spermatozoa exposed peritoneal fluid of women with endometriosis. This study was interventional experimental design conducted in the laboratory (in vitro) with spermatozoa as a research subject. The study was conducted at Aster Clinic, Dr. Hasan Sadikin Hospital / Faculty of Medicine, Padjadjaran University-Bandung from March to November 2013. Fifteen sperm samples were prepared and treated with three different methods. The first treatment group was incubated with 5µM lycopene for 30 minutes and then exposed to peritoneal fluid of endometriosis. The second treatment group was given the peritoneal fluid of endometriosis. While the third group was given the sperm wash medium. Examination of viability, motility, morphology, DNA fragmentation using the SCA method, whereas MDA levels using colorimetric method. Analysis was performed on four times, 0, 3, 6, and 24 hours. As the results, the viability of spermatozoa in group one which was treated by lycopene incubated in the peritoneal fluid of women with endometriosis was higher than without lycopene. There was no different in motility between group one and two. The morphology of spermatozoa in group one was maintained significantly better than group two and three. There was no statistical different in DNA fragmentation between all groups. The MDA levels in group one was significantly lower than other groups. In conclusion, lycopene use in the sperm preparation is proven to be useful in maintaining quality of spermatozoa, especially its viability and morphology, as well as lowering MDA levels.

Key words: DNA fragmentation, endometriosis, lycopene, malondialdehyde, morphology, motility, spermatozoa, viability

PENDAHULUAN

Sel gamet pria atau spermatozoa merupakan sel utama dari sistem reproduksi pria, sel tersebut bersifat haploid dan berbeda dengan sel tubuh lain, baik dalam bentuk, fungsi maupun sifatnya. Spermatozoa terdiri dari 4 bagian yaitu: 1) Kepala, pada bagian ini tersimpan inti sel dan di dalam inti tersebut terdapat materi genetik yang tersusun dalam kromosom yang juga menentukan jenis kelamin anak, materi genetik tersebut membawa sifat dari pria yang menghasilkan spermatozoa 2) Leher, merupakan bagian yang menghubungkan bagian kepala dan bagian tengah 3) Bagian tengah, pada bagian ini tersimpan mitokondria yang merupakan struktur dari sebuah sel yang berfungsi menghasilkan energi untuk kelangsungan hidup dan gerak spermatozoa 4) Bagian ekor, merupakan alat gerak spermatozoa untuk menuju sel telur melalui saluran reproduksi. Apabila terdapat gangguan spermatozoa baik dalam pembentukan produksinya maupun gangguan lingkungan makro dan mikro suasana saluran reproduksi wanita sebelum fertilisasi, maka keadaan ini dapat menyebabkan gangguan kesuburan pasangan suami istri yang disebut infertilitas.

Infertilitas merupakan gagalnya pasangan usia reproduksi untuk mendapatkan kehamilan setelah 12 bulan atau lebih usia pernikahannya dengan frekuensi hubungan suami-istri teratur (2 atau 3 kali seminggu) tanpa perlindungan kontrasepsi. Pengertian ini didasarkan pada penelitian epidemiologi bahwa secara umum 80–90% pasangan suami-istri (pasutri) akan hamil dalam 12 bulan usia pernikahannya. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan bahwa sekitar 8–10% atau sekitar 50–80 juta pasutri di dunia mengalami masalah infertilitas. Angka infertilitas di negara maju dilaporkan mencapai sekitar 5–8%, sedangkan di negara berkembang mencapai 30%. Berdasarkan hasil sensus penduduk di Indonesia pada 2004 diketahui bahwa terdapat sekitar 3 juta (12%) pasutri yang mengalami infertilitas. Angka infertilitas yang relatif tinggi ini memerlukan perhatian khusus dari para klinisi, peneliti dan pengambil kebijakan di Indonesia.

Masalah infertilitas seringkali menjadi masalah yang pelik bagi keutuhan rumah tangga dan dapat menimbulkan dampak psikologis yang merugikan bagi pasangan suami istri. Penyebab infertilitas sampai saat ini masih didominasi oleh penyakit endometriosis karena dapat menimbulkan gangguan pada peritoneum, tuba, ovarium, dan uterus. Gangguan infertilitas akibat endometriosis ternyata bukan hanya menyebabkan patologi pada saluran reproduksi wanita, namun dapat juga mengganggu suasana dan properti imunologi dari lendir serviks, sel endometrium dalam mempersiapkan implantasi dan cairan tuba Falopii akibat gangguan imunologi dan stres oksidatif.

Endometriosis merupakan penyakit ginekologik progresif akibat adanya pertumbuhan jaringan mirip kelenjar dan stroma endometrium di luar rongga uterus. Endometriosis merupakan salah satu penyebab terjadinya infertilitas. Lesi endometriosis dapat

berproliferasi dan menyusuk pada jaringan sekitar, yang dapat mengakibatkan pengerasan jaringan (fibrosis), perlekatan dan distorsi organ yang kemudian dapat mengganggu proses fertilisasi oleh spermatozoa. Jaringan susukan ektopik ini juga dapat tumbuh mandiri yang terkait dengan proses haid di endometrium. Keadaan ini menyebabkan adanya pemajanan oleh serpih haid sehingga dapat mengakibatkan peradangan menahun dan peningkatan produksi beberapa sitokin proinflamasi.

Jaringan ektopik endometriosis dapat mempengaruhi kondisi zilir peritoneum. Perubahan kondisi zilir peritoneum tersebut diantaranya adalah perubahan volume dan fungsi beberapa komponen imunologis yang meliputi monosit-makrofag fagositik, sel *Natural Killer* (NK cells), limfosit T sitotoksik, sel B, atau mediator inflamasi seperti asitokin. Zilir peritoneum wanita penderita endometriosis juga mengalami peningkatan konsentrasi dan aktivasi makrofag, konsentrasi sitokin *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), faktor tumbuh yang berasal dari makrofag (*macrophage-derived growth factor*), dan faktor penstimulasi koloni makrofag (*macrophage colony stimulating factor/M-CSF*). Stimulasi makrofag dan aktivasi sel imun dapat meningkatkan pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) atau stres oksidatif dalam jumlah besar di zilir peritoneum wanita dengan endometriosis.

Zilir peritoneum dapat menyebar ke dalam tuba Falopii dan kavum uteri. Oleh karena itu perubahan komponen pada zilir peritoneum dapat memengaruhi proses fertilisasi. Perubahan komponen zilir peritoneum pada penderita endometriosis mengakibatkan perubahan kondisi lingkungan tuba menjadi kurang optimal bagi sperma untuk melakukan fertilisasi. Kondisi tersebut dapat berakibat pada penurunan kemampuan gerak dan peningkatan kerusakan DNA sperma. Keadaan inilah yang dapat mengakibatkan proses fertilisasi alami terganggu dan berakhir pada infertilitas.

Peningkatan kadar ROS diketahui terjadi di serum dan zilir peritoneum penderita endometriosis. Stres oksidatif tersebut terbukti dapat bersifat toksik terhadap sperma dengan merusak membran sel, menginduksi kerusakan DNA dan juga apoptosis pada sperma. Pemajanan ROS terhadap sperma yang berlebih dapat mengakibatkan akumulasi lipid peroksidasi membran yang mengakibatkan membran plasma kehilangan fluiditas dan integritasnya yang dibutuhkan pada kejadian fusi membran dalam fertilisasi.

Kualitas DNA spermatozoa telah terbukti berperan penting dalam menjaga potensi reproduksi pria. Kemampuan fertilisasi spermatozoa tidak hanya dipengaruhi oleh kompetensi fungsionalnya namun juga integritas DNA. Kerusakan DNA sperma yang diakibatkan stress oksidatif dapat mengganggu integritas DNA yang dibutuhkan untuk mencapai dan mempertahankan perkembangan embrio normal. Kerusakan DNA yang terjadi dapat mengakibatkan apoptosis embrio, gangguan proses perkembangan, implantasi, bahkan dapat mengakibatkan kelainan pada janin. Keadaan ini juga menjadi penyebab

kegagalan kehamilan dan infertilitas pada wanita dengan endometriosis. Analisis semen klasik seperti konsentrasi sperma, motilitas dan morfologi memberikan evaluasi kompetensi fungsional spermatozoa saja, namun tidak selalu dapat merefleksikan kualitas DNA spermatozoa. Oleh karena itu analisis kualitas spermatozoa pada penelitian ini juga disertakan pemeriksaan fragmentasi DNA.

Integritas inti spermatozoa diduga merupakan penentu yang paling penting terhadap morfologi kepala spermatozoa, namun keterkaitan keduanya belum banyak diteliti. Beberapa peneliti menduga bahwa perubahan pada pepadatan kromatin sperma pria infertil yang kemungkinan terkait defisiensi protamine atau oksidasi sulfhidril, dapat berkontribusi terhadap kerusakan morfologi kepala, sehingga memengaruhi penilaian morfologi spermatozoa keseluruhan.

Stress oksidatif dapat masuk ke dalam sitoplasma dan memengaruhi kerja mitokondria dalam metabolisme energi yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa. Stress oksidatif juga dapat mengganggu polimerisasi dan depolimerisasi aktin miosin pada ekor yang selanjutnya dapat mengakibatkan gangguan pergerakan dari spermatozoa. Akumulasi ROS pada spermatozoa dapat mengakibatkan *depleksi adenosine triphosphate* (ATP), peroksidasi lipid dan fosforilasi aksonemal yang tidak memadai. Kondisi tersebut dapat mengganggu pergerakan ekor spermatozoa. Oleh karena itu, keberadaan stres oksidatif juga berpengaruh terhadap motilitas sperma.

ROS bersifat toksik terhadap sel manusia, tetapi secara normal juga dihasilkan oleh tubuh sebagai produk samping dari metabolisme oksigen. Beberapa jenis sel seperti leukosit dan spermatozoa juga memiliki mekanisme untuk menghasilkan ROS dengan tujuan tertentu. Umumnya sel dalam tubuh juga mengekspresikan gen penghasil protein yang penting dalam melindungi sel dari dampak buruk ROS sebagai upaya mempertahankan kelangsungan hidup. Oleh karena itu, gen pengekspresi antioksidan pada sel tubuh mencerminkan upaya penyeimbangan prooksidan/antioksidan yang dihasilkan lingkungan sel.

Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya bahwa membran plasma spermatozoa yang kaya akan asam lemak tak jenuh memiliki kerentanan terhadap ROS terkait peroksidasi lipid. Struktur selular dan fungsi metabolisme spermatozoa dapat mengalami gangguan sebagai hasil dari peroksidasi lipid yang disebabkan ROS. Kadar peroksidasi lipid yang dihasilkan dapat ditentukan dengan menilai kadar malondialdehid (MDA) yang merupakan produk stabil dari peroksidasi lipid.

Di alam terdapat berbagai macam sumber antioksidan, seperti buah dan sayuran yang banyak mengandung senyawa antioksidan. Beberapa senyawa antioksidan yang telah diketahui di antaranya adalah *L-carnitine*, likopen, vitamin C, dan beberapa senyawa polifenol lainnya. Di antara berbagai macam senyawa antioksidan, likopen merupakan salah satu senyawa antioksidan yang dianggap paling kuat dalam mengimbangi kerja senyawa oksidatif.

Likopen merupakan suatu karotenoid lipofilik yang bersifat antioksidan dan prooksidan. Aktivitas antioksidan dari karotenoid umumnya bersifat katalitik dan efektif menangkap radikal bebas. Kemampuan likopen tersebut terbukti dapat melindungi lipid membran dan DNA di beberapa tipe sel dari kerusakan yang disebabkan senyawa oksidatif secara *in vitro*.

Uraian di atas memunculkan gagasan untuk memanfaatkan likopen untuk membantu kelangsungan hidup dan menjaga keadaan spermatozoa dalam proses fertilisasi pada penderita endometriosis. Penambahan antioksidan tersebut diharapkan dapat melindungi sperma dari cekaman oksidatif yang tinggi di dalam zalir peritoneal dengan endometriosis, sehingga viabilitas, motilitas, morfologi dan integritas DNA spermatozoa dapat terjaga baik. Upaya ini bertujuan untuk meningkatkan keberhasilan kehamilan pada penderita endometriosis.

METODE

Penelitian ini berlangsung selama satu tahun sejak Maret sampai dengan November 2013. Lima belas sampel spermatozoa dipreparasi dan diberi perlakuan dengan tiga metoda yang berbeda

Bahan

Spermatozoa

Spermatozoa yang digunakan merupakan hasil donor dari sukarelawan. Pada penelitian ini didapatkan sampel spermatozoa dari 15 orang donor. Spermatozoa kemudian diskriminasi dan dilakukan preparasi.

Zalir peritoneum

Zalir peritoneum yang digunakan merupakan zalir peritoneum yang berasal dari wanita dengan endometriosis stadium III. Pengambilan zalir peritoneum dilakukan pada saat dilakukan tindakan laparoskopi.

Perlakuan dengan Likopen

Likopen yang digunakan dilarutkan dalam tetrahydrofuran (THF) dengan konsentrasi penggunaan 5µM.

Spermatozoa hasil preparasi kemudian dibagi menjadi beberapa aliquot untuk digunakan dalam eksperimen dengan kelompok perlakuan sebagai berikut:

- i. Kelompok I: aliquot spermatozoa diinkubasi dalam likopen 5 umol/L selama 30 menit pada suhu 25°C kemudian dicampur dengan zalir peritoneum wanita dengan endometriosis. Aliquot dievaluasi pada jam ke-0, -3, -6, dan -24 setelah inkubasi.
- ii. Kelompok II: spermatozoa dicampur dengan zalir peritoneum wanita dengan endometriosis. Aliquot dievaluasi pada jam ke-0, -3, -6, dan -24 setelah inkubasi.
- iii. Kelompok III: aliquot spermatozoa dicampur dengan media *human tubal fluid* sebagai kontrol. Aliquot dievaluasi pada jam ke-0, -3, -6, dan -24 setelah inkubasi.

Penilaian kualitas spermatozoa didasarkan pada empat variabel yaitu viabilitas, motilitas, morfologi dan fragmentasi DNA. Penilaian spermatozoa tersebut dilakukan menggunakan piranti lunak Sperm Class Analyzer (SCA). Sedangkan penilaian kadar MDA dilakukan menggunakan metoda kolorimetrik.

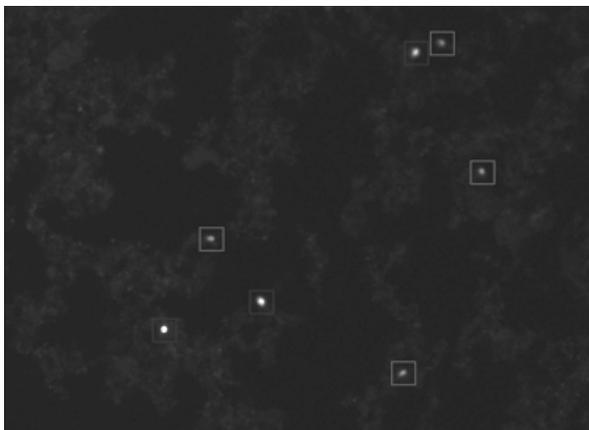
Analisis Data

Untuk mengetahui normalitas distribusi data numerik motilitas dan viabilitas sperma dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk, data berdistribusi normal bila nilai $P > 0,05$. Untuk membandingkan antara motilitas, morfologi, viabilitas dan fragmentasi DNA spermatozoa pre dan pasca inkubasi dengan zalir peritoneum wanita dengan endometriosis, dan zalir endometriosis pada sperma yang sebelumnya diinkubasi likopen digunakan uji t berpasangan bila data berdistribusi normal dan digunakan uji non-parametrik *Wilcoxon signed-rank test* bila data tidak berdistribusi normal. Korelasi fragmentasi DNA dianalisis dengan ANOVA untuk membandingkan nilai rerata kerusakan DNA sperma untuk perlakuan yang berbeda. *Simultaneous mutiple pairwise comparison* teknik dilakukan untuk untuk semua kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan dengan Tukey Test. *Spearman's rank correlation* kemudian digunakan untuk menilai indepedensi antara motilitas, morfologi, viabilitas, dan fragmentasi DNA. Kemaknaan hasil uji ditentukan berdasarkan nilai $P < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pemeriksaan viabilitas menjadi salah satu parameter untuk menilai pengaruh keberhasilan likopen dalam mempertahankan kualitas dan kelangsungan hidup spermatozoa. Viabilitas sel bergantung pada karakteristik selular, seperti keutuhan membran sel dan kondisi fisiologis sel. Integritas membran sel pada spermatozoa dapat dideteksi menggunakan pewarnaan fluoresens vitalitas FluoVit®. Pemeriksaan dilakukan menggunakan mikroskop fluoresens.



Gambar 1. Spermatozoa yang diwarnai dengan Fluoovit
 Sel yang berwarna merah merupakan spermatozoa yang mati (tidak viabel), sedangkan sel yang berwarna biru merupakan spermatozoa yang masih hidup (viabel).

Hasil analisis perbandingan viabilitas sperma pada ketiga kelompok perlakuan terdapat pada Tabel 4.1. Hasil menunjukkan adanya perbedaan viabilitas dari setiap perlakuan di tiap waktu pengamatan yaitu jam ke -0, -3, -6, dan -24. Viabilitas di jam ke-0 menunjukkan adanya perbedaan viabilitas yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol ($p > 0,05$). Viabilitas di jam ke-3 menunjukkan adanya perbedaan viabilitas yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol ($p > 0,05$). Viabilitas di jam ke-6 menunjukkan adanya perbedaan viabilitas yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol ($p < 0,05$). Viabilitas di jam ke-24 menunjukkan adanya perbedaan viabilitas yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol ($p < 0,001$).

Tabel 1. Perbandingan Viabilitas Sperma pada ketiga Kelompok Perlakuan

Viabilitas Sperma (Jam pengamatan)	Kelompok Perlakuan			Nilai p (Uji Friedman)
	Likopen (n=15)	ZP (n=15)	Kontrol (n=15)	
1. Jam 0 :				0,091
- Median	72,2	46,3	50	
- Rentang	37,8-90,9	11,5-90,0	25-80,1	0,247
2. Jam 3 :				
- Median	56,5	42,9	47,9	0,008
- Rentang	26,1-100	0,5-85,0	5-72,7	
3. Jam 6 :				<0,001
- Median	51,52	18,2	23,3	
- Rentang	16,7-75	0-70	6,8-100	
4. Jam 24 :				
- Median	36,8	9,1	17,9	
- Rentang	1,2-91,5	0-29,2	3,3-92,9	

Analisis perbandingan viabilitas antar waktu pengamatan pada tiap perlakuan juga disajikan pada tabel 1. Analisis tersebut membandingkan nilai viabilitas antara waktu pengamatan pada tiap perlakuan. Perbandingan viabilitas pada kelompok waktu jam ke-0 dengan jam ke-3 pada kelompok perlakuan likopen dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p > 0,05$, namun perbedaan viabilitas bermakna terlihat pada kelompok ZP. Perbandingan viabilitas pada kelompok waktu jam ke-3 dengan jam ke-6 pada ketiga kelompok perlakuan likopen, ZP dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p > 0,05$, sedangkan perbandingan viabilitas pada kelompok waktu jam ke-6 dengan jam ke-24 pada kelompok perlakuan likopen dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p > 0,05$, namun perbedaan viabilitas bermakna terlihat pada kelompok ZP.

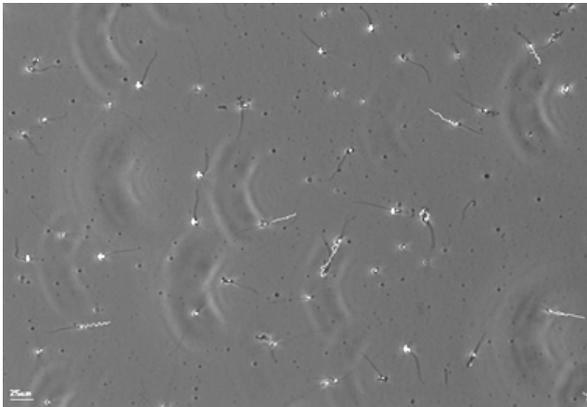
Tabel 2. Perbandingan Viabilitas Sperma antar perlakuan

Jam Pengamatan (Jam)	Nilai p (Uji Wilcoxon)		
	Likopen vs ZP	Likopen vs Kontrol	ZP vs Kontrol
1. Jam ke-6	0,004	0,047	0,140
2. Jam ke-24	0,001	0,030	0,006

Hasil perbandingan viabilitas sperma antar perlakuan dapat dilihat pada table 4.2. Perbandingan viabilitas dilakukan terhadap tiap kelompok perlakuan pada waktu jam ke-6 dan ke-24. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan viabilitas yang bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-6 ($p < 0,05$). Hasil analisis juga menunjukkan antara bahwa terdapat perbedaan viabilitas yang bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kontrol pada jam ke-6 ($p < 0,05$). Namun, perbandingan antara kelompok ZP

dan kontrol di jam ke-6 menunjukkan perbedaan motilitas yang tidak bermakna ($p>0,05$). Perbandingan viabilitas antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-24 menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p<0,05$). Hasil analisis menunjukkan antara bahwa terdapat perbedaan viabilitas yang bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kontrol pada jam ke-24 ($p<0,05$). Perbandingan antara kelompok ZP dan kontrol di jam ke-24 juga menunjukkan perbedaan viabilitas yang bermakna ($p<0,05$).

Parameter lain yang digunakan dalam penelitian ini dalam menentukan kualitas spermatozoa adalah motilitas. Analisis motilitas yang dilakukan menggunakan metoda SCA Motility. Selain data numerik, piranti lunak tersebut juga menyajikan data pendukung berupa hasil pengamatan yang ditangkap kamera dan dianalisis. Hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil analisis motilitas spermatozoa dengan SCA Motility
 Sel yang ditandai merah merupakan spermatozoa dengan pergerakan Rapid Progressive Motility (tipe a); sel ditandai warna biru merupakan spermatozoa dengan pergerakan Slow Progressive Motility (tipe b); sel ditandai warna hijau merupakan spermatozoa dengan pergerakan Non-progressive Motility (tipe c); sel ditandai warna kuning merupakan spermatozoa imotil (tipe d).

Hasil analisis perbandingan motilitas spermatozoa pada ketiga kelompok perlakuan terdapat pada Tabel 4.3. Hasil menunjukkan adanya perbedaan motilitas dari setiap perlakuan di tiap waktu pengamatan yaitu jam ke -0, -3, -6, dan -24. Perhitungan statistik menunjukkan adanya perbedaan motilitas yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol di jam ke-0 ($p >0,05$). Perhitungan statistik menunjukkan adanya perbedaan motilitas yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol di jam ke-3 ($p >0,05$). Motilitas di jam ke-6 menunjukkan adanya perbedaan motilitas yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol ($p <0,05$). Motilitas di jam ke-24 menunjukkan adanya perbedaan motilitas yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol di jam ke-24 ($p >0,05$).

Analisis perbandingan motilitas antar waktu pengamatan pada tiap perlakuan juga disajikan pada tabel 3. Analisis tersebut membandingkan nilai motilitas antara waktu pengamatan pada tiap

Tabel 3. Perbandingan Motilitas Sperma dari ketiga Kelompok Perlakuan

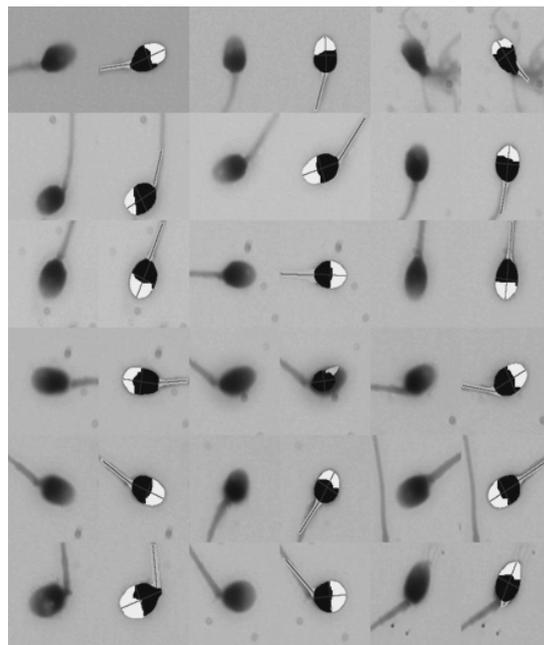
Motilitas Sperma (Jam pengamatan)	Perlakuan			Nilai p (Uji Friedman)
	Likopen (n=15)	ZP (n=15)	Kontrol (n=15)	
1. Jam 0 :				0,802
- Median	85,4	87,95	88	
- Rentang	36,4-95,6	59,0-97,6	50,6-94,4	
2. Jam 3 :				0,282
- Median	79,3	82,1	85,7	
- Rentang	46,6-94,1	44,7-96,8	50,1-91,8	
3. Jam 6 :				0,038
- Median	72,2	70,1	79	
- Rentang	27-89,4	28,1-89,8	26,0-89,9	
4. Jam 24 :				0,247
- Median	27,5	28	31,2	
- Rentang	18,6-37,9	10,3-43,4	10,3-53,4	

perlakuan. Seluruh perbandingan waktu pada tiap kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan motilitas yang bermakna, kecuali pada waktu jam ke-0 dibandingkan dengan jam ke-3 baik pada kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p>0,05$.

Tabel 4. Perbandingan Motilitas Sperma antar perlakuan

Jam pengamatan	Nilai p (Uji Wilcoxon)		
	Likopen vs ZP	Likopen vs Kontrol	ZP vs Kontrol
Jam 6	0,477	0,140	0,031

Hasil perbandingan motilitas sperma antar perlakuan dapat dilihat pada tabel 4. Perbandingan motilitas dilakukan terhadap tiap kelompok perlakuan pada waktu jam ke-6. Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan motilitas yang bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-6 dengan nilai $p>0,05$. Hasil analisis juga menunjukkan antara bahwa tidak terdapat perbedaan motilitas yang bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kontrol pada jam ke-6 dengan nilai $p>0,05$. Namun, perbandingan antara kelompok ZP dan kontrol di jam ke-0 menunjukkan adanya perbedaan motilitas yang bermakna dengan nilai $p<0,05$.



Gambar 3. Hasil pengamatan morfologi spermatozoa menggunakan SCA Morphology dengan Pewarnaan SpermBlue
 Area kepala yang ditandai warna kuning merupakan daerah akrosom, area warna biru adalah area inti, dan warna hijau merupakan ekor.

Tabel 5. Perbandingan Morfologi Sperma dari ketiga Kelompok Perlakuan

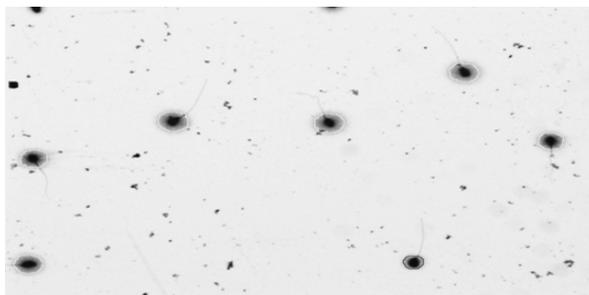
Morfologi Sperma (Jam pengamatan)	Perlakuan			Nilai p (Uji Friedman)
	Likopen (n=15)	ZP (n=15)	Kontrol (n=15)	
1. Jam 0 :				0,083
- Median	6	4,8	6	
- Rentang	0-25	0-8	0-16	
2. Jam 3 :				0,015
- Median	6,5	2	3	
- Rentang	1-32	0-9	0-10	
3. Jam 6 :				0,431
- Median	4	3	4	
- Rentang	0-24	0-9	0-14	
4. Jam 24 :				0,156
- Median	6	1,3	1	
- Rentang	0-16	0-17	0-26	

Hasil analisis perbandingan morfologi sperma pada ketiga kelompok perlakuan terdapat pada tabel 5. Morfologi di jam ke-0 menunjukkan perbedaan morfologi yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p > 0,05$. Morfologi di jam ke-3 menunjukkan adanya perbedaan morfologi yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p < 0,05$. Morfologi di jam ke-6 menunjukkan adanya perbedaan morfologi yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p > 0,05$. Morfologi di jam ke-24 menunjukkan perbedaan morfologi yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol di 24 jam dengan nilai $p > 0,05$.

Tabel 6 Perbandingan Morfologi Sperma antar perlakuan

a (Jam pengamatan)	Nilai p (Uji Wilcoxon)		
	Likopen vs ZP	Likopen vs Kontrol	ZP vs Kontrol
Jam 3	0,012	0,053	0,329

Hasil perbandingan morfologi sperma antar perlakuan dapat dilihat pada tabel 6. Perbandingan morfologi dilakukan terhadap tiap kelompok perlakuan pada waktu jam ke-3. Hasil analisis menunjukkan perbedaan morfologi yang bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-3 dengan nilai $p < 0,05$. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa perbedaan morfologi antara kelompok likopen dibandingkan dengan kontrol pada jam ke-3 tidak bermakna dengan nilai $p > 0,05$. Perbandingan morfologi antara kelompok ZP dan kontrol di jam ke-3 juga menunjukkan perbedaan morfologi yang tidak bermakna dengan nilai $p > 0,05$.



Gambar 4. Hasil pengamatan fragmentasi DNA menggunakan Halosperm

Spermatozoa yang ditandai dengan lingkaran kuning merupakan spermatozoa yang tidak mengalami fragmentasi DNA. Spermatozoa yang ditandai dengan lingkaran merah merupakan spermatozoa yang mengalami fragmentasi DNA.

Analisis fragmentasi DNA spermatozoa dalam penelitian ini menggunakan metoda Halosperm dan piranti lunak SCA. Fragmentasi DNA dapat dianalisis berdasarkan kemunculan 'halo' di kepala spermatozoa. Diameter ukuran 'halo' dapat merefleksikan tingkat fragmentasi DNA yang terjadi. Semakin kecil ukuran 'halo' menggambarkan kondisi integritas DNA yang kurang baik atau dapat dianggap mengalami fragmentasi DNA. Sebaliknya, spermatozoa yang menghasilkan 'halo' yang besar menggambarkan kondisi integritas DNA yang masih baik dan fragmentasi DNA dapat dianggap tidak terjadi atau sangat rendah.

Tabel 7. Perbandingan Fragmentasi DNA dari ketiga Kelompok Perlakuan

Fragmentasi DNA (Jam pengamatan)	Perlakuan			Nilai p (Uji Friedman)
	Likopen (n=15)	ZP (n=15)	Kontrol (n=15)	
1. Jam 0 :				0,420
- Median	18,9	24,5	8,9	
- Rentang	1,4-89,5	0,2-93,7	0,4-73,5	
2. Jam 3 :				0,214
- Median	15,5	9,8	6,2	
- Rentang	0-97,6	1,0-88,7	0,6-88,7	
3. Jam 6 :				0,627
- Median	9,3	11,2	11,2	
- Rentang	2,0-44,4	1,4-87,9	0,8-94,4	
4. Jam 24 :				0,627
- Median	10,6	9,1	12,0	
- Rentang	1,2-87,3	3,0-91,7	1,8-86,7	

Hasil analisis perbandingan fragmentasi DNA pada ketiga kelompok perlakuan terdapat pada tabel 7. Fragmentasi DNA di jam ke-0 menunjukkan perbedaan fragmentasi DNA yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p > 0,05$. Fragmentasi DNA di jam ke-3 menunjukkan adanya perbedaan fragmentasi DNA yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p > 0,05$. Fragmentasi DNA di jam ke-6 menunjukkan adanya perbedaan fragmentasi DNA yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p > 0,05$. Fragmentasi DNA di jam ke-24 menunjukkan perbedaan fragmentasi DNA yang tidak bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol di jam ke-24 dengan nilai $p > 0,05$.

Tabel 8. Perbandingan Kadar MDA sperma dari ketiga Kelompok Perlakuan

MDA (µM) (Jam pengamatan)	Perlakuan			Nilai p (Uji Friedman)
	Likopen (n=15)	ZP (n=15)	Kontrol (n=15)	
1. Jam 0 :				0,011
- Median	114,48	192,10	98,22	
- Rentang	24,79-802,73	36,38-1735,74	14,48-479,05	
2. Jam 3 :				0,038
- Median	192,10	332,36	137,83	
- Rentang	34,45-664,88	37,02-1893,87	24,46-758,92	
3. Jam 6 :				0,005
- Median	242,18	643,79	117,06	
- Rentang	67,46-1537,02	39,92-2354,90	32,19-1179,70	
4. Jam 24 :				<0,001
- Median	481,95	915,77	139,44	
- Rentang	60,86-1461,66	193,87-2820,92	9,01-1404,01	

Hasil analisis perbandingan kadar MDA sperma pada ketiga kelompok perlakuan terdapat pada tabel 8. Kadar MDA di jam ke-0 menunjukkan adanya perbedaan kadar MDA yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p < 0,05$. Kadar MDA di jam ke-3 menunjukkan adanya perbedaan kadar MDA yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p < 0,05$. Kadar MDA di jam ke-6 menunjukkan adanya perbedaan kadar MDA yang bermakna antara

kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p < 0,05$. Kadar MDA di jam ke-24 menunjukkan adanya perbedaan kadar MDA yang bermakna antara kelompok likopen, ZP dan kontrol dengan nilai $p < 0,001$.

Tabel 9. Perbandingan Kadar MDA antar perlakuan

MDA (Jam pengamatan)	Nilai p (Uji Wilcoxon)		
	Likopen vs ZP	Likopen vs Kontrol	ZP vs Kontrol
1. Jam 0	0,256	0,061	0,027
2. Jam 3	0,036	0,776	0,036
3. Jam 6	0,023	0,027	0,005
4. Jam 24	0,005	0,030	0,003

Hasil perbandingan kadar MDA sperma antar perlakuan dapat dilihat pada tabel 9. Hasil analisis menunjukkan perbedaan kadar MDA yang tidak bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-0 dengan nilai $p > 0,05$. Hasil analisis juga menunjukkan terdapat perbedaan kadar MDA yang tidak bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kontrol pada jam ke-0 dengan nilai $p > 0,05$. Namun, perbandingan antara kelompok ZP dan kontrol di jam ke-0 menunjukkan perbedaan kadar MDA yang bermakna dengan nilai $p < 0,05$. Perbandingan kadar MDA antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-3 menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p < 0,05$. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan kadar MDA yang tidak bermakna pada kelompok likopen dibandingkan dengan kontrol pada jam ke-3 dengan nilai $p > 0,05$. Perbandingan antara kelompok ZP dan kontrol di jam ke-3 menunjukkan perbedaan kadar MDA yang bermakna dengan nilai $p < 0,05$. Pada jam ke-6 dan ke-24 terdapat perbedaan kadar MDA yang bermakna antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP, likopen dibandingkan dengan kontrol, dan kelompok ZP dibandingkan dengan kontrol dengan nilai $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas spermatozoa merupakan salah satu faktor terpenting yang memengaruhi keberhasilan fertilisasi. Viabilitas juga dapat menjadi salah satu parameter kualitas spermatozoa. Pemajanan spermatozoa pada zalir peritoneum wanita dengan endometriosis diduga dapat mengakibatkan perubahan kualitas spermatozoa seperti adanya perubahan viabilitas. Hasil penelitian pada tabel 4.1 menunjukkan viabilitas dari ketiga kelompok perlakuan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada jam ke-0 dan -3 belum terdapat perbedaan viabilitas yang bermakna antara ketiga kelompok perlakuan. Namun hasil menunjukkan viabilitas spermatozoa yang diberi likopen memiliki viabilitas yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok ZP dan kontrol, sedangkan viabilitas yang paling rendah terlihat pada kelompok ZP.

Viabilitas spermatozoa terlihat mengalami penurunan pada kelompok perlakuan dengan likopen, tanpa likopen dan kontrol. Penurunan viabilitas seiring pertambahan waktu juga merupakan suatu kondisi alami spermatozoa. Singer melaporkan bahwa viabilitas spermatozoa menurun beberapa saat setelah ejakulasi. Viabilitas pada jam ke-6 terlihat adanya perbedaan yang bermakna pada ketiga kelompok perlakuan. Pada jam ke-6 spermatozoa yang diberi

likopen menunjukkan tingkat viabilitas yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok ZP ataupun kontrol. Jika dibandingkan dengan jam ke-3, tingkat viabilitas pada kelompok likopen jam ke-6 tidak mengalami penurunan yang bermakna. Hal serupa juga terlihat pada kelompok kontrol yang tidak mengalami penurunan viabilitas yang bermakna dibandingkan dengan jam ke-3. Tingkat viabilitas kelompok ZP merupakan yang terendah dibanding kelompok perlakuan lainnya.

Perbandingan viabilitas pada jam ke-6 antara kelompok likopen dan ZP menunjukkan perbedaan yang bermakna berdasarkan statistik. Viabilitas spermatozoa pada kelompok likopen lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok ZP. Hasil tersebut menunjukkan bahwa likopen berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa. Perbandingan viabilitas antara kelompok likopen dan kontrol juga menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Viabilitas kelompok likopen lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan paparan hasil tersebut maka dapat terbukti bahwa likopen memiliki potensi proteksi terhadap zalir peritoneum dan kondisi lingkungan bagi spermatozoa.

Hasil pengamatan pada jam ke-24 juga menunjukkan adanya perbedaan viabilitas yang bermakna pada ketiga kelompok perlakuan. Viabilitas tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan likopen, kemudian yang terendah adalah pada kelompok ZP. Hal tersebut memperkuat dugaan bahwa likopen dapat mempertahankan kondisi spermatozoa tetap baik meskipun berada dalam lingkungan dengan cekaman oksidatif (zalir peritoneum endometriosis).

Likopen dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa dengan membantu ketahanan integritas membran terhadap stress oksidatif. Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya bahwa membran lipid pada membran sel spermatozoa merupakan bagian sel yang paling rentan terhadap stress oksidatif. Integritas struktur fosfolipidnya dapat terganggu dengan adanya stress oksidatif. Inkubasi spermatozoa dalam likopen dapat mengakibatkan adanya penyerapan likopen pada spermatozoa, dan terjadi akumulasi tertinggi pada lipid membran. Dengan adanya akumulasi likopen pada lipid membran, terjadi kesetimbangan antara stress oksidatif dan antioksidan di membran spermatozoa. Oleh karena itu, integritas membran spermatozoa tetap terjaga baik sehingga viabilitas spermatozoa dapat dipertahankan.

Hasil analisis perbandingan pada ketiga kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan motilitas spermatozoa di tiap waktu pengamatan. Pada jam ke-0 dan ke-3 tidak menunjukkan adanya perbedaan motilitas yang bermakna antara ketiga kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa likopen maupun zalir peritoneum belum menunjukkan pengaruh yang berarti terhadap motilitas spermatozoa hingga jam ke-3.

Motilitas spermatozoa terlihat berbeda pada ketiga kelompok perlakuan pada jam ke-6. Hasil menunjukkan pada jam ke-6 motilitas paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol, dan yang paling rendah adalah kelompok zalir peritoneum. Hasil tersebut menunjukkan adanya pengaruh dari zalir peritoneum

endometriosis terhadap penurunan motilitas spermatozoa. Hal tersebut terjadi karena motilitas spermatozoa bergantung pada integritas membran mitokondria yang komponen utamanya adalah fosfolipid. Jika asam lemak dalam fosfolipid teroksidasi oleh radikal bebas, maka spermatozoa dapat mengalami kerusakan dan motilitasnya terganggu.

Hasil penelitian juga menunjukkan adanya pengaruh pemberian likopen terhadap motilitas spermatozoa pada jam ke-6. Hal tersebut terlihat dari hasil analisis statistik pada tabel 4.4 yang menunjukkan perbandingan antara kelompok likopen dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal tersebut juga menunjukkan bahwa likopen dapat membantu mempertahankan motilitas sperma menyerupai kondisi kontrol meskipun dalam lingkungan zalir peritoneum endometriosis.

Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya bahwa stress oksidatif dapat masuk ke dalam sitoplasma dan memengaruhi kerja mitokondria dalam metabolisme energi yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa. Penambahan likopen dapat mengimbangi akumulasi ROS pada spermatozoa sehingga dapat mencegah deplesi ATP, peroksidasi lipid dan fosforilasi aksonemal tetap memadai. Sehingga pergerakan ekor spermatozoa dapat berlangsung baik dan motilitas spermatozoa terjaga.

Stress oksidatif juga dapat mengganggu polimerisasi dan depolimerisasi aktin miosin pada ekor yang selanjutnya dapat mengakibatkan gangguan pergerakan dari spermatozoa. Pemberian likopen dapat mengimbangi stress oksidatif yang mengganggu, sehingga proses polimerisasi dan depolimerisasi aktin miosin dapat berjalan dengan baik. Kondisi tersebut dapat menghasilkan motilitas spermatozoa yang baik dan normal.

Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian lain yang menggunakan senyawa antioksidan sebagai suplemen secara *in vivo*. Penelitian Suleiman menunjukkan adanya pengaruh pemberian vitamin E terhadap luaran motilitas spermatozoa. Vitamin E diketahui dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Hal tersebut menunjukkan adanya potensi penggunaan senyawa antioksidan likopen per oral untuk meningkatkan luaran kualitas spermatozoa.

Penelitian Zini menunjukkan adanya penurunan motilitas yang signifikan pada spermatozoa yang diinkubasi pada H_2O_2 (50 mmol/L) selama 2 jam, sedangkan pada penelitian ini penurunan motilitas spermatozoa yang diinkubasi dalam cairan peritoneum tidak berbeda signifikan selama waktu inkubasi 3 jam. Perbedaan hasil tersebut menunjukkan adanya perbedaan antara H_2O_2 dan zalir peritoneum dalam memengaruhi motilitas spermatozoa. Perbedaan tersebut dapat disebabkan karena terdapat berbagai komponen sitokin dan penginduksi ROS lainnya di dalam zalir peritoneum, sedangkan H_2O_2 merupakan senyawa kimiawi yang bersifat toksik.

Hasil penelitian yang menunjukkan adanya pengaruh positif likopen terhadap motilitas spermatozoa. Hal tersebut dapat menjadi dasar penggunaan likopen sebagai senyawa antioksidan yang dapat digunakan untuk terapi maupun suplemen

terhadap pasien pria dengan kualitas motilitas spermatozoa yang kurang baik dan pada pasien pria dengan infertilitas yang tidak jelas.

Penilaian kualitas spermatozoa pada penelitian ini juga berdasar pada penilaian morfologi. Hasil penelitian menunjukkan pada jam ke-3 terdapat perbedaan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal pada tiap kelompok perlakuan. Hasil penelitian pada jam ke-3 menunjukkan kelompok perlakuan dengan jumlah morfologi normal yang paling tinggi adalah kelompok likopen. Hal tersebut menunjukkan bahwa likopen dapat mempertahankan morfologi spermatozoa dari pengaruh zalir peritoneum endometriosis.

Dari hasil tampak bahwa pada jam ke-6 mulai terjadi penurunan viabilitas dan motilitas pada semua kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada likopen dapat bekerja optimal hanya sampai jam ke-6. Spermatozoa yang diberi likopen hanya dapat dipertahankan kualitasnya hingga 6 jam.

Mekanisme likopen dalam mempertahankan morfologi spermatozoa diduga terkait dengan pematatan atau kondensasi inti spermatozoa. Stress oksidatif diketahui dapat memengaruhi kondensasi materi genetik di inti spermatozoa, sehingga dapat memengaruhi dan mengubah morfologi kepala. Penambahan likopen kemungkinan dapat mempertahankan mekanisme kondensasi sehingga pematatan materi genetik di inti dapat berlangsung baik dan menghasilkan morfologi kepala spermatozoa yang normal.

Pengaruh likopen dalam mempertahankan morfologi spermatozoa tidak berlangsung dalam rentang waktu yang lama. Pada pengamatan jam ke-6 dan -24 terlihat pada ketiga kelompok tersebut tidak terdapat perbedaan jumlah spermatozoa dengan morfologi normal. Hasil tersebut menunjukkan bahwa likopen tidak dapat mempertahankan morfologi spermatozoa hingga jam ke-6 maupun -24.

Pemberian likopen tidak menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan terhadap morfologi spermatozoa dibandingkan dengan kelompok spermatozoa yang tidak diberi likopen. Hal tersebut memunculkan dugaan tidak adanya pengaruh likopen terhadap morfologi, akan tetapi terdapat dugaan lain terkait karakteristik spermatozoa itu sendiri. Penelitian Venkatesh menunjukkan tidak adanya korelasi antara stress oksidatif dan morfologi spermatozoa pada pria infertil. Pernyataan tersebut memunculkan asumsi bahwa pajanan zalir peritoneum yang mengandung stress oksidatif memang tidak memengaruhi atau merusak morfologi spermatozoa. Di samping itu, penentuan morfologi spermatozoa lebih banyak dipengaruhi pada tahap spermatogenesis dan penyempurnaannya pada kapasitas di tuba falopii.

Fragmentasi DNA merupakan salah satu parameter yang dijadikan dasar analisis kualitas spermatozoa. Beberapa penelitian merekomendasikan untuk menyertakan pemeriksaan fragmentasi DNA sebagai salah satu analisis spermatozoa, terutama dalam program fertilisasi *in vitro* maupun inseminasi buatan.

Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya perbedaan tingkat fragmentasi DNA spermatozoa yang bermakna antar tiap kelompok perlakuan.

Tingkat fragmentasi DNA spermatozoa pada kelompok perlakuan dengan likopen, tanpa likopen dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal tersebut menggambarkan bahwa tidak adanya pengaruh pemberian likopen terhadap fragmentasi DNA spermatozoa.

Tingkat fragmentasi DNA spermatozoa pada tiap kelompok perlakuan yang diberi likopen juga tidak menunjukkan perbedaan bermakna berdasarkan waktu. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perubahan fragmentasi DNA spermatozoa pada keempat waktu pengamatan. Berdasarkan data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa pemberian likopen tidak mampu memperbaiki integritas DNA spermatozoa.

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa pemberian antioksidan tidak memberikan efek terhadap integritas DNA spermatozoa. Pada penelitian Donnelly menunjukkan bahwa pemberian asam askorbat maupun α -tocopherol pada medium preparasi sperma tidak memengaruhi tingkat integritas DNA spermatozoa. Namun kedua antioksidan tersebut dapat memproteksi kerusakan DNA spermatozoa yang diinduksi H_2O_2 . Hasil penelitian tersebut sesuai dengan hasil pengamatan pada penelitian ini. Pemberian perlakuan likopen tidak memberikan pengaruh yang signifikan dalam menurunkan kerusakan oksidatif DNA spermatozoa.

Fragmentasi DNA yang tidak berbeda signifikan baik pada kelompok spermatozoa yang diberi perlakuan likopen maupun yang tidak diberi likopen dapat disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah struktur DNA spermatozoa itu sendiri. DNA spermatozoa memiliki tingkat kondensasi enam kali lebih tinggi dibandingkan DNA di sel somatik, sehingga strukturnya relatif sangat stabil. Antioksidan di sel somatik mayoritas terdapat pada sitoplasma, sedangkan antioksidan banyak ditemukan di plasma semen di luar spermatozoa karena spermatozoa kehilangan sebagian besar sitoplasma selama maturasi. Sehingga perbedaan pengemasan DNA dan distribusi antioksidan antara spermatozoa dan sel somatik tersebut dapat mengakibatkan variasi luaran pengaruh pemberian antioksidan terhadap oksidasi DNA.

Perbaikan integritas DNA spermatozoa yang tidak terjadi pada semua kelompok perlakuan dapat berkaitan dengan adanya faktor stress oksidatif. Pada penelitian ini juga dilakukan pemeriksaan kondisi stress oksidatif berdasarkan kadar MDA. Penelitian menunjukkan stress oksidatif terjadi pada spermatozoa pada jam ke 0. Kadar MDA pada kelompok spermatozoa kontrol lebih rendah dibandingkan dengan kedua kelompok perlakuan lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa paparan zalir peritoneum pada spermatozoa dapat meningkatkan produksi ROS dan kondisi stress oksidatif. Oleh karena itu, pada kelompok perlakuan likopen dan tanpa likopen yang diinkubasi dalam cairan peritoneum menunjukkan kadar MDA yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diberi cairan peritoneum. Hal tersebut membuktikan bahwa cairan peritoneum dapat menginduksi peningkatan produksi ROS dan kondisi stress oksidatif.

Hasil analisis menunjukkan perbedaan kadar MDA yang tidak bermakna antara kelompok likopen

dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-0. Kondisi tersebut dapat disebabkan karena belum adanya pengaruh kerja dari likopen atau pengaruh zalir peritoneum terhadap kadar MDA pada spermatozoa. Pada pengamatan jam ke-3, -6, dan -24, kadar MDA pada kelompok perlakuan dengan likopen lebih rendah dibandingkan kelompok tanpa likopen. Perbandingan kadar MDA antara kelompok likopen dibandingkan dengan kelompok ZP pada jam ke-3, -6 dan -24 menunjukkan perbedaan dengan nilai kemaknaan yang semakin besar seiring dengan pertambahan waktu inkubasi. Hasil tersebut menunjukkan adanya pengaruh pemberian likopen yang dapat menekan produksi MDA baik pada jam ke-3, -6 dan ke-24. Berdasarkan hal tersebut maka dapat disimpulkan bahwa senyawa antioksidan likopen mampu mengurangi kondisi stress oksidatif pada spermatozoa.

Penelitian Suleiman menunjukkan hasil penelitian yang serupa dengan penelitian ini. Pemberian antioksidan vitamin E *in vivo* dapat menurunkan kadar MDA spermatozoa dengan signifikan. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian ini di mana pemberian likopen secara *in vitro* dapat menurunkan kadar MDA spermatozoa dengan signifikan. Berdasarkan paparan tersebut dapat disimpulkan bahwa antioksidan seperti likopen dan vitamin E dapat digunakan untuk menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kualitas spermatozoa, akan tetapi hingga kini belum terdapat penelitian yang membandingkan potensi antioksidan mana yang lebih efektif. Teori menunjukkan bahwa likopen memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan vitamin E, sehingga kemungkinan besar likopen memiliki kemampuan yang lebih baik dalam meningkatkan kualitas luaran spermatozoa. Namun hal tersebut masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua variabel yang diuji dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang sesuai dengan dugaan (hipotesis). Likopen berpengaruh signifikan berdasarkan uji statistik terhadap variabel viabilitas dan kadar MDA saja, akan tetapi tidak pada variabel motilitas, morfologi dan fragmentasi DNA. Berdasarkan hal tersebut likopen masih layak untuk digunakan dalam aplikasi terkait proteksi spermatozoa terhadap stress oksidatif. Likopen memiliki potensi yang besar dalam mempertahankan ketahanan hidup dan menekan kondisi stress oksidatif internal spermatozoa.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh zalir peritoneum terhadap kualitas spermatozoa. Kondisi stress oksidatif internal spermatozoa yang meningkat karena zalir peritoneum dapat memengaruhi keberhasilan konsepsi alami maupun dalam reproduksi berbantu seperti IVF. Stress oksidatif dapat merusak membran spermatozoa sehingga dapat menghambat fertilisasi dan menghambat DNA paternal yang rusak dalam menghasilkan embrio. Teknik reproduksi berbantu seperti IVF-ICSI memang dapat mengatasi permasalahan keberhasilan fertilisasi terkait kerusakan DNA atau pun kualitas spermatozoa yang buruk, namun banyak sekali terjadi kegagalan pada masa blastokista ataupun tahap awal embrio. Hal tersebut dapat memunculkan potensi lahirnya bayi dengan kerusakan DNA paternal. Konsekuensinya hingga kini belum jelas diketahui, namun diduga dapat menginisiasi kerusakan

genetik dan kanker pada usia dini.

Analisis korelasi persentase penurunan antar variabel pada pengamatan jam ke-24 terhadap pengamatan pada jam ke-0 menunjukkan adanya beberapa korelasi yang bermakna. Persentase penurunan motilitas berkorelasi positif dengan penurunan viabilitas dan morfologi pada kelompok perlakuan likopen. Hasil tersebut menunjukkan penurunan viabilitas disertai juga dengan penurunan motilitas spermatozoa. Jumlah spermatozoa yang hidup berkesesuaian dengan jumlah spermatozoa yang masih memiliki motilitas yang baik. Pernyataan tersebut berdasarkan pada kondisi alami spermatozoa, yaitu spermatozoa yang memiliki motilitas yang baik menunjukkan bahwa spermatozoa tersebut masih memiliki kemampuan hidup (viabilitas) yang baik pula, meskipun tidak setiap spermatozoa yang viabel selalu memiliki motilitas yang baik.

Hasil penelitian menunjukkan persentase penurunan motilitas berkorelasi positif dengan persen kenaikan MDA pada kelompok kontrol pada pengamatan jam ke-24 terhadap pengamatan pada jam ke-0. Hasil tersebut menunjukkan adanya pengaruh kenaikan MDA terhadap kemampuan gerak spermatozoa. Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya bahwa stress oksidatif dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa. Peningkatan kadar MDA yang terjadi dapat memperbesar gangguan motilitas spermatozoa. Berdasarkan hasil analisis korelasi tersebut dapat terlihat bahwa peningkatan kadar MDA memang merupakan mekanisme alamiah yang produksinya bersifat internal dan semakin meningkat sesuai dengan berjalannya waktu, sehingga berakibat pada terjadinya gangguan atau menurunnya tingkat motilitas spermatozoa pada jam ke-24.

Persentase penurunan viabilitas juga terlihat berkorelasi positif dengan persentase penurunan morfologi pada kelompok perlakuan likopen pada pengamatan jam ke-24 terhadap pengamatan pada jam ke-0. Hasil tersebut menunjukkan bahwa berkurangnya jumlah spermatozoa dengan morfologi normal berpotensi memiliki hubungan dengan kondisi viabilitas spermatozoa yang semakin menurun. Faktor yang paling memengaruhi viabilitas spermatozoa adalah kondisi integritas membran sel spermatozoa terutama pada bagian kepala. Spermatozoa yang tidak viabel diduga mengalami gangguan integritas membran sel pada bagian kepala, sehingga hilangnya integritas tersebut secara langsung akan berdampak pada bentuk morfologi terutama bentuk kepala yang berbeda dibandingkan dengan normal. Kondisi tersebut berdampak pada tingkat morfologi spermatozoa keseluruhan.

Hal yang menjadi keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak adanya perbandingan kadar MDA dalam cairan peritoneum dengan senyawa peroksidatif lain

sebagai normalisasi/standarisasi tingkat stress oksidatif. Selain itu, tipe pelarut yang digunakan untuk pelarutan senyawa antioksidan juga belum optimal mengingat tetrahidrofuran (THF) masih memiliki sifat toksik pada konsentrasi dan tipe sel tertentu.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa likopen dapat mempertahankan viabilitas dan motilitas juga menekan kadar lipid peroksidase. Likopen juga dapat dianggap mampu memproteksi spermatozoa terhadap kerusakan yang disebabkan oleh ROS yang dihasilkan oleh zaliir peritoneum pasien endometriosis. Penambahan likopen dapat digunakan dalam aplikasi reproduksi berbantu seperti inseminasi intrauterin dan IVF sehingga kualitas spermatozoa dapat bertahan lebih lama.

DAFTAR PUSTAKA

- Speroff L, Fritz MA. *Endometriosis. In Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Edisi ke-8. Philadelphia: Lippincott William & Wilkin; 2010.
- Winkjosastro. *Ilmu Kandungan*. Jakarta. Edisi.: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohadjo.; 2005.
- Clinical gynecologic endocrinology & infertility*. Edisi ke-8. Fritz MA, Speroff L, penyunting. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- Practice bulletin no. 114: *management of endometriosis*. Obstet Gynecol. 2010;116(1):223-36.
- Agarwal N, Subramanian A. *Endometriosis - morphology, clinical presentations and molecular pathology*. *J Lab Physicians*. 2010;2(1):1-9.
- Ho HN, Wu MY, Yang YS. *Peritoneal cellular immunity and endometriosis*. *Am J Reprod Immunol*. 1997;38(6):400-12.
- Zeller JM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP. *Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis*. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 1987;13:78-82.
- Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S, Barone N, D'Agata R, Vicari E, dkk. *Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis*. *J Clin Immunol*. 2007;27(2):152-62.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. *Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective*. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(5): 641-50.
- Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. *Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility*. *Fertil Steril*. 2008;90(2):247-57.
- Matsuzaki S, Schubert B. *Oxidative stress status in normal ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis*. *Fertil Steril*. 2010;93(7):2431-2.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. *Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update*. *Am J Reprod Immunol*. 2008;59(1):2-11.
- Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. *Role of antioxidants in the treatment of male infertility*. *Int J Urol*. 2009;16(5):449-57.
- Saleh RA, Agarwal A. *Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice*. *J Androl*. 2002;23(6):737-52
- Natali I. *Sperm Preparation Techniques for Artificial Insemination - Comparison of Sperm Washing, Swim Up, and Density Gradient Centrifugation Methods*. Dalam: Manafi M, penyunting. *Artificial Insemination in Farm Animals*; 2011..

- Mahfouz R, Sharma R, Thiyagarajan A, Kale V, Gupta S, Sabanegh E, dkk. *Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species*. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2141-6.
- Mahfouz RZ, du Plessis SS, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E, Agarwal A. *Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress*. *Fertil Steril*. 2010;93(3):814-21.
- Beletti ME, Mello ML. *Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology*. *Theriogenology*. 2004;62:398-402.
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB. *Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice*. *Nat Genet*. 2001;28:82-6.
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y. *HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility*. *Mol Cell Biol*. 2005;25:7107-19.
- Laudat A, Lecourbe K, Guechot J, Palluel AM. *Values of sperm thiobarbituric acid- reactive substance in fertile men*. *Clin Chim Acta*. 2002;325:113-15.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R. *Oxidative stress & male infertility*. *Indian J Med Res*. 2009;129(4):357-67.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. *Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation*. *J Androl*. 2001;22(2):316-22.
- Aitken RJ, Fisher H. *Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk*. *Bioassays*. 1994;16:259-67.
- Sanocka D, Kurpisz M. *Reactive oxygen species and sperm cells*. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:12-9.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction*. *Fertil Steril* 2003;79:829-43.
- Girotti MJ, Khao N, Melellen BA. *Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients*. *J Trauma* 1991;31:32-5.
- Story EN, Kopec RE, Schwartz SJ, Harris GK. *An update on the health effects of tomato lycopene*. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2010;1:189-210.
- Kelkel M, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. *Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene*. *Free Radic Res*. 2011;45(8):925-40.
- Srinivasan M, Sudheer AR, Pillai KR, Kumar PR, Sudhakaran PR, Menon VP. *Lycopene as a natural protector against gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770(4):659-65.
- Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. *Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E*. *J Androl*. 1996;17:530-7.
- Mukai C, Okuno M. *Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement*. *Biol Reprod*. 2004;71:540-7.
- Venkatesh S, Singh G, Gupta NP, Kumar R, Deecaraman M, Dada R. *Correlation of sperm morphology and oxidative stress in infertile men*. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2009;7(1):29-34.
- Allamaneni SSR, Agarwal A, Rama S, Ranganathan P, Sharma RK. *Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa*. *Asian J Androl*. 2005;7:86-92.
- Rumley AG, Woodward M, Rumely A, Rumely J, Lowe GDO. *Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease*. *QJ Med*. 2004;97:809-16.
- Colagar AH, Pouramir M, Marzony ET, Jorsaraei SGA. *Relationship between Seminal Malondialdehyde Levels and Sperm Quality in Fertile and Infertile Men*. *Braz Arch Biol Technol*. 2009;52(6):1387-92.
- IARC. *Malondialdehyde*. Monograph. 1987;71:1037-47.
- Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. *Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. *Int J Androl*. 2003;26:279-85.
- Aitken RJ, Krausz C. *Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome*. *Reproduction*. 2001;122:497-506.
- Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D. *Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease*. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:65-70.