

Pengaruh Glutation dan Penggantian Plasma Semen Kerbau dengan Plasma Semen Sapi terhadap Kualitas Semen Beku Kerbau Rawa (*Bubalus bubalis*)

RIASARI GAIL SIANTURI¹, B. PURWANTARA², I. SUPRIATNA², AMROZI² dan P. SITUMORANG¹

¹Balai Penelitian Ternak, PO Box 221 Bogor 16002

e-mail: rsgsianturi@hotmail.com

²Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

(Diterima 5 Juni 2012; disetujui 9 Agustus 2012)

ABSTRACT

SIANTURI, R.G., B. PURWANTARA, I. SUPRIATNA, AMROZI and P. SITUMORANG. 2012. Effect of glutathione and bovine seminal plasma in lactose extender on viability of swamp buffalo frozen semen. *JITV* 17(3): 169-178.

The aim of the study was to investigate the effect on viability of frozen swamp buffalo semen of glutathione and bovine seminal plasma in lactose extender. Semen from two swamp buffalo bulls was collected twice weekly using an artificial vagina. Pooled, good-quality fresh semen was divided into three parts and centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes in preparation for three treatments-substitution of buffalo seminal plasma with zero, 50 or 100% bovine seminal plasma (BS0, BS50 and BS100, respectively). Each semen aliquot was then divided in two parts, on which was diluted with lactose extender containing 1 mM glutathione (GSH) and the other diluted with lactose extender without GSH (0 mM GSH). Extended semen from all six treatments was cooled to 5°C and then frozen in 0.25 ml straws. Mean motility percentages 0 and 30 minutes post thaw (PTM 0' and 30') with GSH were 38.33 and 34.29%, significantly higher ($P < 0.05$) than treatments without GSH (31.67 and 25.95%). PTM 0' and 30' were also higher ($P < 0.05$) with no substitution of bovine seminal plasma (BS0) than when buffalo seminal plasma was replaced with bovine seminal plasma at either 50 or 100%. Averages were 40.00 vs 34.46 and 30.54% (BS0 vs BS50 and BS100) at thawing and 36.96 vs 28.36 and 25.36% 30 minutes post-thaw. Mean percentages of live sperm (LD), intact plasma membrane (MPU) and intact acrosomal membrane (TAU) at thawing were not significantly different with or without addition of GSH. However, at 30' post thawing, TAU and MPU were significantly higher in GSH treatments than in those without GSH: 61.50 vs. 58.19% (MPU) and 59.81 vs. 57.38% (TAU). Mean percentages of LD, TAU and MPU 30' post thawing were higher with no substitution of buffalo seminal plasma (BS0) ($P < 0.05$) than to BS50 and BS100 treatments. In conclusion, the addition of glutathione (GSH) improved the quality of frozen swamp buffalo semen, but the partial substitution of buffalo seminal plasma with bovine seminal plasma provided no beneficial effects.

Key Words: Swamp buffalo, Semen, Antioxidant, Glutathione, Seminal plasma

ABSTRAK

SIANTURI, R.G., B. PURWANTARA, I. SUPRIATNA, AMROZI dan P. SITUMORANG. 2012. Pengaruh Glutation dan penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku kerbau rawa (*Bubalus bubalis*). *JITV* 17(3): 169-178.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan glutathione dan penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi terhadap viabilitas semen beku kerbau rawa. Semen dari dua ekor kerbau rawa ditampung dua kali seminggu menggunakan vagina buatan. Semen kemudian dibagi tiga bagian untuk tiga perlakuan penggantian seminal plasma kerbau BS0, BS50 dan BS100. Seminal plasma kerbau dibuang sebanyak 0, 50 dan 100% dari volume digantikan seminal plasma sapi dengan volume yang sama (BS0, BS50 dan BS100). Kemudian masing-masing bagian dibagi dua, satu bagian diencerkan dengan pengencer laktosa dengan 0,1 mM glutathione (GSH) dan bagian yang lainnya dengan pengencer laktosa tanpa GSH (0 mM GSH). Semen encer didinginkan ke 5°C, diekuilibrasikan, dikemas dalam 0,25-ml straw, dibekukan dan disimpan pada N₂ cair. Rataan persentase motilitas setelah thawing 0 dan 30 menit (PTM 0' dan 30') dengan penambahan GSH adalah 38,33 dan 34,29% dan nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan tanpa GSH (31,67 dan 25,95%). PTM 0' dan 30' juga lebih tinggi ($P < 0,05$) tanpa penggantian plasma semen kerbau (BS0) dibandingkan dengan BS50 dan BS100 yaitu 40,00 vs 34,46 dan 30,54% (BS0 vs BS50 dan BS100) untuk thawing 0' dan 36,96 vs 28,36 dan 25,36% untuk thawing 30'. Rataan persentase sperma hidup (LD), tudung akrosom utuh (TAU) dan membran plasma utuh (MPU) setelah thawing 0' tidak berbeda nyata dengan dan tanpa GSH. Setelah thawing 30', TAU dan MPU nyata lebih tinggi dengan penambahan GSH dibandingkan dengan tanpa GSH, 61,50 vs 58,18 (MPU) dan 59,81 vs 57,38 (TAU). Rataan persentase LD, TAU dan MPU setelah thawing 30' nyata lebih baik tanpa penggantian plasma semen (BS0) dibandingkan dengan BS50 dan BS100. Dapat disimpulkan bahwa penambahan glutathione (GSH) dapat meningkatkan kualitas semen beku kerbau dan penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi tidak diperlukan.

Kata Kunci: Swamp Buffalo, Semen, Antioksidan, Glutation, Plasma Semen

PENDAHULUAN

Keberhasilan inseminasi buatan (IB) sangat tergantung pada berbagai aspek, baik aspek ternak betina (kesehatan reproduksi dan kualitas sel telur), ternak jantan (kualitas spermatozoa yang di IB) dan aspek manusia (keterampilan inseminator, ketepatan deteksi berahi dan waktu inseminasi). Keberhasilan IB pada kerbau telah dilaporkan lebih rendah dibandingkan sapi, dan salah satu faktornya adalah karena kualitas semen beku kerbau yang secara umum lebih rendah dibandingkan dengan sapi, karena lebih mudah terjadi kerusakan selama proses pembekuan (GOYAL *et al.*, 1996; ANDRABI, 2009). NAIR *et al.* (2006) mendapatkan bahwa aktifitas ketiga enzim antioksidan yakni *superoxide simutase* (SOD), *gluthatione peroxidase* (GPx) dan *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) nyata lebih rendah pada semen kerbau dibandingkan dengan semen sapi yang didinginkan di *refrigerator*. Hal ini menunjukkan bahwa sperma kerbau akan lebih sensitif terhadap kerusakan oksidatif yang disebabkan peroksidasi lemak. Proses pembekuan dan *thawing* semen beku akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa pasca *thawing* (*post thawing motility*) yang pada akhirnya akan menurunkan angka konsepsi (LEWIS dan AITKEN, 2005).

Pada proses pembuatan semen beku yang meliputi pendinginan, pembekuan dan *thawing*, baik secara fisik maupun kimia akan meningkatkan produksi senyawa *reactive oxygen species* (ROS). ROS adalah senyawa yang secara alamiah diproduksi dalam metabolisme seluler. ROS merupakan pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif, dihasilkan dalam proses oksidasi dalam sel seperti proses oksidatif makanan menjadi energi (HALLIWEL dan WHITEMAN, 2004; VALKO *et al.*, 2007). ROS yang paling berpengaruh pada sistem reproduksi khususnya pada spermatozoa adalah *superoxide anion* ($O_2^{\cdot-}$), *hydroxiyl radicals* (OH^{\cdot}), *peroxyl radicals* (RO_2^{\cdot}) dan *hydrogen peroxide* (H_2O_2) (HALLIWEL dan WHITEMAN, 2004; TREMALLEN, 2008). ROS akan mudah berikatan dengan asam lemak tidak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*) yang merupakan mayoritas komposisi struktur dari membran spermatozoa (TREMALLEN, 2008; AGARWAL *et al.*, 2006). Walaupun spermatozoa dan plasma semen memiliki pertahanan enzimatik dan non-enzimatik endogenous yang dapat menangkal ROS (KANKOFER, *et al.*, 2005), namun produksi ROS yang berlebihan dan tidak seimbang akan melemahkan sistem pertahanan enzimatik antioksidan sehingga menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif pada spermatozoa dapat mengganggu stabilitas membran plasma spermatozoa (TREMALLEN, 2008) yang pada akhirnya akan menurunkan viabilitas dan fertilitas spermatozoa (MICHAEL *et al.*, 2009). Dalam jumlah yang sedikit, ROS secara normal diperlukan sebagai mediator dalam

berbagai fungsi sel-sel tubuh dalam lingkungan aerob (AITKEN dan BENNETTS, 2006).

Berbagai usaha telah dilakukan untuk mengurangi efek stres oksidatif, misalnya dengan penggunaan berbagai antioksidan ekogenous pada media pengencer semen yang berhasil memperbaiki viabilitas spermatozoa, misalnya glutation (STRADAIOLI *et al.*, 2007). Glutation ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$; γ -Glu-CysH-Gly; GSH; BM 307,33 g/mol) merupakan tripeptida (cystein, glutamine, glycin) yang secara normal tersebar luas pada hampir semua sel, mempunyai peran penting dalam mekanisme perlindungan sel terhadap stres oksidatif yang disebabkan oleh ROS (STRADAIOLI *et al.*, 2007). Glutation terdapat dalam sel spermatozoa maupun plasma semen dalam konsentrasi sekitar $32,49 \pm 5,10 \mu\text{M/ml}$ pada plasma semen kerbau (JAIN dan ANAND, 1976); 3,5 mM pada spermatozoa sapi (AGRAWAL dan VANHA-PERTULLA, 1988); 1,2-3,5 mM pada spermatozoa manusia (LI, 1975; ALVAREZ *et al.*, 1987; GADEA *et al.*, 2011). Kriopreservasi semen sapi dengan menggunakan pengencer Tris-kuning telur-glislerol dapat menyebabkan terjadinya penurunan level GSH mencapai lima kali (BILODEAU *et al.*, 2001). Glutation dapat bereaksi dengan ROS sebagai kofaktor bagi glutation peroksidase yang berfungsi sebagai katalis untuk mengurangi efek toksik dari H_2O_2 terhadap stabilitas membran spermatozoa (BILODEAU *et al.*, 2001).

Plasma semen baik pada sapi maupun pada kerbau (AHMAD *et al.*, 1996) diketahui dapat menurunkan persentase motilitas, *liveability* maupun indeks *liveability* spermatozoa. Plasma semen kerbau diketahui mengandung *inhibitory factor* yang lebih tinggi dibanding plasma semen sapi (SAHNI dan MOHAN, 1990). Hal tersebut karena tingginya konsentrasi kalsium, fosfat teresterifikasi dan berbagai enzim pemecah posfat dalam plasma semen kerbau (COCKRILL, 1974). BHATTACHARYA (1974) juga mendapatkan bahwa protein plasma semen kerbau lebih rendah dibandingkan dengan plasma semen sapi (485 vs 756 mg/100 ml) dan NPN (*non nitrogen protein*) pada plasma semen kerbau lebih tinggi dibandingkan dengan plasma semen sapi (109 vs 48 mg/100 ml). Kandungan protein dalam plasma semen yang lebih rendah mempunyai tendensi kerusakan membran plasma akibat pembekuan lebih tinggi mencapai 55,05% (GOYAL *et al.*, 1996; ASADPOUR *et al.*, 2007; ANDRABI, 2009), sedangkan NPN diduga merupakan faktor antimotilitas spermatozoa (BHATTACHARYA, 1974).

Beberapa penelitian pembekuan semen ejakulat kerbau maupun semen dari epididimis kerbau dengan penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi telah dilakukan (LODHI *et al.*, 1998; AMIN *et al.*, 1999; HEROLD, 2004) dengan hasil yang masih bervariasi dari cenderung lebih baik sampai sangat nyata memperbaiki viabilitas spermatozoa ejakulat,

namun memberikan respon negatif pada pembekuan spermatozoa epididimis.

Penelitian ini dilakukan adalah bertujuan untuk melihat pengaruh glutation dan plasma semen sapi pada media pengencer semen kerbau laktosa terhadap kualitas semen beku kerbau rawa.

MATERI DAN METODE

Penampungan semen

Dua ekor kerbau rawa jantan berumur sekitar 4-5 tahun dan satu ekor sapi FH jantan digunakan sebagai sumber semen. Semen kerbau ditampung dua kali seminggu menggunakan vagina buatan. Segera setelah dilakukan penampungan semen kerbau dibawa ke laboratorium untuk di periksa kualitas baik makroskopis maupun mikroskopis yang meliputi, volume, warna, konsistensi, gerakan massa, konsentrasi, persentase spermatozoa hidup (%LD), tudung akrosom utuh (%TAU) dan membran plasma utuh (%MPU). Hanya semen kerbau yang normal dan layak kualitasnya dipakai dalam penelitian ini.

Pengenceran

Sapi FH yang menjadi sumber plasma semen ditampung semennya dan disentrifus (3000 rpm, 15 menit) (AHMAD *et al.*, 1996) untuk memisahkan spermatozoa dari plasma semennya. Bagian supernatan (plasma semen) diambil untuk digunakan dalam penelitian.

Semen kerbau dibagi menjadi 3 bagian dan disentrifus (3000 rpm, 10 menit) selanjutnya supernatan dipisahkan sesuai dengan perlakuan penggantian plasma kerbau dengan plasma semen sapi yaitu 0% (BS0), 50% (BS50) dan 100% (BS100). Untuk perlakuan kontrol BS0 endapan spermatozoa yang terbentuk dari semen kerbau yang di sentrifus dicampur kembali dengan plasmanya. Pada perlakuan penggantian plasma semen BS50, 50% plasma semen kerbau diganti dengan plasma semen sapi dengan volume yang sama. Sementara itu, pada perlakuan penggantian plasma semen BS100, seluruh plasma semen kerbau dan diganti plasma semen sapi sebanyak volume plasma semen kerbau yang telah diambil tadi.

Selanjutnya semen kerbau dari tiga perlakuan plasma semen masing-masing dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama diencerkan dengan pengencer laktosa larutan A yang mengandung glutation (GSH) 1 mM dan bagian lainnya dengan pengencer laktosa larutan A tanpa glutation (0 mM) (Tabel 1). Konsentrasi GSH 1 mM merupakan konsentrasi GSH optimum pada semen sapi dan kerbau (TRIWULANNINGSIH *et al.*, 2003; KUSUMANINGRUM *et al.*, 2007).

Tabel 1. Komposisi pengencer laktosa yang mengandung glutation dan tanpa glutation

Bahan	Laktosa	
	Tahap I (Larutan A)	Tahap II (Larutan B)
Larutan laktosa (ml)*	80	80
Glukosa (gram)	0,5	0,5
Kuning telur % (v/v)	20	20
Gliserol % (v/v)	2,4	11,6
Streptomycine (µgram)	75.000	75.000
Peniciline (IU)	75.000	75.000
GSH (glutation) (mM)	1,0 atau 0**	1,0 atau 0**

* 11 g laktosa dilarutkan dalam 100 ml H₂O

** 1,0 = 1,0 mM GSH (untuk media dengan GSH (+GSH))
0 = 0 mM GSH (untuk media tanpa GSH (-GSH))

Pengenceran dilakukan dengan dua tahap, pengenceran tahap pertama dilakukan menggunakan pengencer laktosa larutan A pada suhu 35°C, dan pada tahap ini dilakukan sehingga mencapai konsentrasi 200 juta/cc. Pengenceran tahap kedua, menggunakan pengencer laktosa larutan B, dilakukan pada saat proses pendinginan mencapai suhu 5°C, dengan dan tanpa glutation.

Pendinginan dan ekuilibrasi

Keenam semen sesuai perlakuan yang sudah diencerkan pada tahap pertaman, selanjutnya masing-masing didinginkan menggunakan mesin pendingin (*cooling machine*) dari suhu 35°C sampai mencapai suhu 5°C dalam waktu penurunan temperatur selama 60 menit. Pada proses pendinginan ini, pengenceran dilanjutkan menggunakan laktosa larutan B yang dilakukan secara bertahap yaitu pada suhu 15°C, 10°C dan 5°C sehingga diperoleh konsentrasi spermatozoa akhir sebesar 100 juta/cc. Selanjutnya dilakukan ekuilibrasi pada suhu 5°C selama 4 jam. Setelah dua jam ekuilibrasi, semen dimasukkan dalam mini straw (0,25 ml), dan ekuilibrasi dalam straw dilanjutkan selama 2 jam.

Pembekuan dan *thawing*

Setelah ekuilibrasi, straw dibekukan dengan jalan diuapkan di atas Nitrogen (N₂) cair (8 cm diatas N₂ cair) selama 10 menit dalam *styrofoam* yang tertutup rapat. Selanjutnya straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair dan disimpan dalam tanki nitrogen cair. Setelah satu minggu semen di *thawing* dengan cara memasukkan straw ke dalam air hangat 37°C selama 15 detik dan

evaluasi kualitas semen dilakukan 0 menit (segera) dan 30 menit setelah *thawing*.

Evaluasi kualitas sperma

Pengamatan mikroskopik terhadap viabilitas spermatozoa adalah persentase motilitas (%M), persentase spermatozoa hidup (%LD), dan jumlah spermatozoa (%) dengan membran plasma yang utuh (%MPU) dan jumlah spermatozoa (%) dengan tudung akrosom yang utuh (%TAU) pada tahapan pengenceran, ekuilibrase, dan *thawing-0'* dan *thawing 30'*. Penghitungan %M, %LD, %MPU dan %TAU mengikuti metode standar pada Laboratorium Reproduksi Balai Penelitian Ternak, Ciawi (AMIN, 1998). Hanya semen kerbau yang normal dan layak kualitasnya (%M >60%, %LD minimal 70% dan konsentrasi >600 juta spermatozoa/ml) (VALE, 2010) yang dipakai dalam penelitian ini.

Rancangan percobaan

Penelitian dilakukan dalam rancangan acak lengkap pola faktorial 2 x 3, dimana sebagai faktor pertama adalah antioksidan glutation yaitu glutation 1 mM (+GSH) dan 0 mM (-GSH) dan faktor kedua adalah plasma semen sapi sebanyak 0, 50 dan 100% (BS0, BS50 dan BS100). Dilakukan enam kali ulangan untuk setiap perlakuan.

Analisis statistik

Semua data yang diperoleh, kecuali data semen segar di analisa statistik menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan perbedaan rata-rata diuji dengan Duncan menggunakan GLM-SAS (SAS INSTITUTE INC., 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas semen segar

Gambaran kualitas semen pada Tabel 2, merupakan rata-rata yang didapatkan dari enam kali penampungan semen dari dua ekor kerbau rawa. Gambaran semen segar dari kedua kerbau menunjukkan bahwa kualitas semen dipakai cukup baik dan dalam kisaran normal dan layak untuk dilakukan proses pembekuan. Secara umum baik dari segi volume, konsentrasi spermatozoa, gerakan massa, persentase sperma hidup, MPU dan TAU; kedua kerbau memiliki kualitas semen segar yang baik dan layak untuk dilakukan pembekuan sesuai dengan kualitas umum semen segar kerbau dan sesuai VALE (2010). Persentase TAU dan MPU sedikit lebih tinggi pada kerbau 1, sedangkan volume semen, konsentrasi sperma dan persentase sperma hidup lebih tinggi pada kerbau 2.

Persentase motilitas dan sperma hidup

Setelah pengenceran dengan media laktosa, penambahan glutation (GSH) belum berpengaruh terhadap rata-rata persentase motilitas sperma (Tabel 3) dibandingkan dengan tanpa GSH yaitu 63,93 vs 63,21% (P > 0,05). Hal ini disebabkan karena kemungkinan besar viabilitas semen pada proses pengenceran masih cukup baik dan belum terjadi *cold shock* karena proses pendinginan dan pembekuan. Pengaruh positif dari penambahan glutation (P < 0,05) terhadap motilitas terlihat saat proses ekuilibrase (5°C) dan *thawing* semen beku. Motilitas sperma pada saat ekuilibrase, dengan GSH nyata lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa GSH (57,50 vs 53,21%). Diperlukan waktu sekitar 1 jam untuk menurunkan suhu dari 35°C sampai dengan 5°C dan selama kurun waktu itu sperma terekspos

Tabel 2. Rataan kualitas semen segar kerbau rawa yang digunakan dalam penelitian

Penilaian	Kerbau 1	Kerbau 2
Makroskopik:		
Volume (ml/ejakulasi)	1,44 ± 0,52	1,76 ± 0,92
Warna	krem keputihan	krem keputihan
Konsistensi	encer – kental	encer – kental
Mikroskopik:		
Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	1070 ± 271	1983 ± 283
Gerakan massa*	++ s/d +++	+++
Persentase sperma hidup (%)	82,17 ± 6,40	87,93 ± 4,76
Persentase Tudung Akrosom Utuh (%)	82,67 ± 2,07	81,59 ± 3,65
Persentase Membran Plasma Utuh (%)	76,75 ± 12,42	73,00 ± 8,60

* +++ = sangat baik

oksigen yang menyebabkan meningkatnya peroksidasi lemak (NAIR *et al.*, 2006; STRADAIOLI *et al.*, 2007; BUCAK *et al.*, 2008). Peroksidasi lemak juga terjadi pada bagian mitokondria yang terdapat pada bagian ekor spermatozoa sehingga berdampak langsung pada motilitas spermatozoa (TREMELLEN, 2008). Glutathione berhasil menekan pengaruh buruk ROS yang timbul selama proses pendinginan yang berefek menurunkan motilitas spermatozoa (KANKOFER *et al.*, 2005; MAIA *et al.*, 2009).

Saat pengenceran, penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi sebanyak 0 dan 50% (BS0 dan BS50) memberikan motilitas yang lebih baik ($P < 0,05$) dibandingkan penggantian seluruhnya (100%) plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi (BS100). Kemungkinan hal ini berhubungan dengan adaptasi terhadap lingkungan yang baru dimana penggantian seluruh plasma semen menyebabkan terjadinya perubahan mendadak terhadap lingkungan sperma secara kimiawi. Menurut AMIN *et al.* (1999) penggantian sebagian atau seluruh plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi diperlukan waktu adaptasi sekitar 5 menit sebelum diencerkan.

Pada penelitian ini, saat ekuilibrase tidak ada perbedaan yang nyata dari motilitas spermatozoa baik pada kelompok BS0, BS50 dan BS100. Kemungkinan pada saat ekuilibrase ini, untuk perlakuan BS100, sperma sudah dapat beradaptasi dengan lingkungan

dengan penggantian seluruh plasma semen dan motilitasnya tidak berbeda dengan perlakuan BS0 dan BS50. Penambahan glutathione dalam medium pengencer secara signifikan ($P < 0,05$) meningkatkan motilitas spermatozoa pasca *thawing* 0-menit (38,33 vs 31,67%) dan *thawing* 30-menit (34,29 vs 25,95%) (Tabel 3). Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh MICHAEL *et al.* (2009) dan MAIA *et al.* (2010) bahwa antioksidan GSH dapat melindungi membran spermatozoa dari kerusakan karena peroksidasi lemak melalui mekanisme terikatnya ROS dengan GSH. Pengaruh ROS dapat dikurangi melalui detoksifikasi menggunakan enzim superoxide dismutase (SOD), katalase, peroxidase maupun agen pereduksi seperti glutathione, asam askorbat, taurine, hypotaurine yang ada pada spermatozoa maupun dalam lingkungan spermatozoa (NAIR *et al.*, 2006; KANKOFER *et al.*, 2005; MAIA *et al.*, 2010). Kemampuan antioksidan untuk membantu motilitas baik *in vivo* maupun *in vitro* terkait dengan peroksidasi lemak yang menjadi penyebab utama kehilangan motilitas pada spermatozoa (AITKEN dan BENNETTS, 2006). Mekanisme meningkatnya peroksidasi lemak terhadap penurunan motilitas berhubungan dengan fluiditas dan integritas membran plasma dan kegagalan sebagian fungsi membran yang kritis bagi pergerakan ekor (AITKEN dan BENNETTS, 2006).

Tabel 3. Pengaruh glutathione dan penggantian plasma semen kerbau terhadap persentase motilitas (%M) spermatozoa

Tahapan	Perlakuan	Plasma semen sapi*			Rataan
		BS0	BS50	BS100	
Pengenceran	+ GSH	65,7 ± 11,6	65,0 ± 7,6	61,1 ± 7,9	63,93
	- GSH	63,9 ± 12,4	64,6 ± 7,9	61,1 ± 7,4	63,21
	Rataan	64,82 ^a	64,82 ^a	61,07 ^b	
Ekuilibrase	+ GSH	56,8 ± 9,9	59,6 ± 19,3	56,1 ± 7,1	57,50 ^a
	- GSH	53,9 ± 11,8	53,6 ± 10,6	52,1 ± 7,3	53,21 ^b
	Rataan	55,36	56,61	54,11	
<i>Thawing</i> 0'	+ GSH	46,42 ± 12,2	36,78 ± 11,9	31,8 ± 8,2	38,33 ^a
	- GSH	33,6 ± 20,2	32,1 ± 17,6	29,3 ± 8,1	31,67 ^b
	Rataan	40,00 ^a	34,46 ^b	30,54 ^b	
<i>Thawing</i> 30'	+ GSH	45,0 ± 10,9	30,0 ± 9,6	27,9 ± 9,1	34,29 ^a
	- GSH	28,9 ± 18,6	26,1 ± 15,9	22,9 ± 7,3	25,95 ^b
	Rataan	36,96 ^a	28,04 ^b	25,36 ^b	

^{a,b} Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

- * BS0 = Tidak ada penggantian plasma semen
 BS50 = 50% plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
 BS100 = 100% plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
 + GSH = Pengencer mengandung 1mM glutathione
 - GSH = Pengencer tidak mengandung glutathione

Secara umum viabilitas semen beku setelah *thawing*, untuk perlakuan penambahan glutation, masih memungkinkan untuk digunakan untuk IB, walau *post thawing motility* (PTM) sudah dalam kisaran minimal yaitu untuk PTM-0-menit dan PTM-30-menit 38,33 dan 34,29%. Dan berdasarkan penelitian ini, kualitas semen beku mempunyai PTM terbaik adalah tanpa menggunakan plasma semen sapi (BS0) dimana PTM-0' dan PTM30' berturut-turut 40,00 dan 36,96%.

Pada Tabel 4, tertera rata-rata persentase sperma hidup dari tahapan proses pembekuan dan setelah *thawing* sperma beku dari masing-masing perlakuan penambahan glutation dan plasma semen sapi. Pemberian glutation tidak berpengaruh pada persentase sperma hidup baik pada saat pengenceran, ekulibrasi dan juga saat *thawing* 0-menit dan 30-menit. Hal ini dapat terjadi karena selama proses pembekuan dan *thawing* yang menyebabkan meningkatnya ROS dan stress oksidasi hanya menurunkan motilitas sebagian sperma namun belum sampai menyebabkan kematian sperma.

Persentase sperma hidup pada saat ekulibrasi dan *thawing* 0' antara perlakuan penggantian plasma semen kerbau BS0 dan BS50 tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) yaitu 73,71 vs 72,89% pada saat ekulibrasi dan 63,00 vs 62,32% pada saat *thawing* 0'. Sementara itu, penggantian plasma semen kerbau seluruhnya (BS100) dengan plasma semen sapi secara nyata ($P < 0,05$) menurunkan persentase sperma hidup yaitu 69,68%

pada ekulibrasi dan 56,36% pada *thawing* 0' bila dibandingkan dengan BS0 dan BS50 namun tidak ditemui adanya interaksi antara penambahan glutation dan penggantian plasma semen kerbau. Hasil yang diperoleh ini tidak selaras dengan yang diperoleh AMIN *et al.* (1999) bahwa penggantian plasma semen kerbau seluruhnya dengan plasma semen sapi menghasilkan sperma hidup (%LD) yang lebih baik dibandingkan tanpa penggantian plasma semen. Hal ini dapat terjadi kemungkinan karena perbedaan kualitas semen kerbau yang digunakan, kualitas plasma semen sapi serta perbedaan dalam metode penelitian yang dipakai.

Berbeda halnya pada saat 30 menit setelah *thawing*, bahwa pada ketiga perlakuan penggantian plasma semen, %LD berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan %LD terbaik pada penggantian plasma semen kerbau BS0 diikuti BS50 dan BS100 (58,25; 54,68 dan 50,11%).

Integritas membran plasma sperma

Integritas membran plasma spermatozoa dapat diamati melalui gambaran persentase membran plasma utuh (%MPU) dan tudung akrosom utuh (%TAU) seperti tertera di Tabel 5 dan 6. Rataan persentase MPU dan TAU setelah pengenceran dan ekulibrasi tidak menunjukkan perbedaan diantara perlakuan, baik pengaruh dari glutation maupun pengaruh penggantian plasma semen kerbau.

Tabel 4. Pengaruh glutation dan penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi dan terhadap persentase sperma hidup (%LD)

Tahapan	Perlakuan	Plasma semen sapi*			Rataan
		BS0	BS50	BS100	
Pengenceran	+ GSH	81,4 ± 5,7	79,4 ± 7,4	77,0 ± 7,7	79,26
	- GSH	79,4 ± 6,7	79,0 ± 6,3	79,0 ± 6,2	79,12
	Rataan	80,36	79,21	78,00	
Ekulibrasi	+ GSH	75,9 ± 3,1	73,0 ± 5,2	68,9 ± 6,2	72,59
	- GSH	71,5 ± 5,2	72,8 ± 4,7	70,5 ± 5,9	71,59
	Rataan	73,71 ^a	72,89 ^a	69,68 ^b	
<i>Thawing</i> 0'	+ GSH	67,9 ± 6,7	63,9 ± 8,2	54,4 ± 7,1	62,05
	- GSH	58,1 ± 9,4	60,8 ± 6,0	58,3 ± 6,0	59,07
	Rataan	63,00 ^a	62,32 ^a	56,36 ^b	
<i>Thawing</i> 30'	+ GSH	61,6 ± 6,1	53,9 ± 5,9	48,1 ± 6,3	54,45
	- GSH	55,1 ± 6,0	55,4 ± 6,4	52,1 ± 7,6	54,24
	Rataan	58,25 ^a	54,68 ^b	50,11 ^c	

^{a,b,c} Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

- * BS0 = Tidak ada penggantian plasma semen
- BS50 = 50% plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
- BS100 = 100% plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
- + GSH = Pengencer mengandung 1mM glutation
- GSH = Pengencer tidak mengandung glutation

Proses pembekuan menyebabkan terjadinya kerusakan spermatozoa baik yang secara fisik karena pembentukan kristal dan pertukaran cairan intra dan ekstraselular, maupun secara kimiawi karena adanya perubahan atau kerusakan struktur membran plasma yang disebabkan oleh peroksidasi lemak. Pengaruh glutation terhadap integritas membran (%MPU dan %TAU) setelah *thawing* tidak berbeda nyata meskipun ada tendensi bahwa penambahan GSH lebih baik. Rataan persentase MPU dan TAU pada BS100, nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan pada perlakuan penggantian plasma semen BS0 dan BS50 yaitu 56,82% vs 64,43 dan 63,82% untuk MPU dan 62,43 vs 66,57 dan 65,53 untuk TAU.

Dengan semakin lamanya ekspos/paparan oksigen terhadap semen selama 30 menit pasca *thawing* tampak bahwa glutation secara nyata dapat mengurangi ($P < 0,05$) stres oksidasi yang dapat menyebabkan kerusakan integritas membran baik MPU yaitu: 61,50% vs 58,19% dan TAU, 59,81 vs 57,38% untuk dengan dan tanpa glutation berturut-turut.

Penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi sebanyak 0 dan 50% menghasilkan %MPU dan %TAU yang tidak berbeda nyata pada tahap pengenceran, ekulibrasi dan *thawing* 0' dan lebih baik dibandingkan dengan perlakuan penggantian plasma

semen kerbau seluruhnya (BS100). Namun pada tahap *thawing* 30', %MPU dan %TAU berbeda nyata ($P < 0,05$) diantara ketiga perlakuan penggantian plasma semen kerbau BS0, BS50 dan BS100.

Tidak ditemui adanya interaksi antara penambahan glutation dan penggantian seminal plasma kerbau dalam penelitian ini pada semua parameter kualitas semen dan pada setiap tahapan pengamatan kualitas semen. Dari keseluruhan hasil penelitian ini, didapatkan bahwa glutation secara nyata mempertahankan motilitas (%M) pada tahap ekulibrasi, setelah *thawing* 0 dan 30 menit. Selain itu glutation juga nyata meningkatkan %MPU dan %TAU pada 30 menit setelah *thawing*, namun untuk persentase sperma hidup (%LD) tidak ada perbedaan yang nyata antara dengan dan tanpa glutation pada seluruh tahapan pengamatan parameter kualitas semen. Sesuai dengan peranannya, glutation sebagai antioksidan primer yang dapat mengurangi peroksidasi lemak pada membran spermatozoa selama proses pembekuan sehingga dapat meningkatkan motilitas dan integritas akrosom setelah *thawing* (KANKOFER *et al.*, 2005; STRADAIOLI *et al.*, 2007; MAIA *et al.*, 2009).

Penggantian seluruh plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi tampaknya tidak berhasil mempertahankan daya hidup, meskipun secara teoritis kandungan protein plasma semen sapi lebih tinggi dan faktor antimotilitas lebih rendah dan asam asam

Tabel 5. Pengaruh glutation dan penggantian plasma semen kerbau terhadap persentase membran plasma utuh (%MPU) spermatozoa kerbau

Tahapan	Perlakuan	Plasma semen sapi*			Rataan
		BS0	BS50	BS100	
Pengenceran	+ GSH	81,0 ± 11,0	80,9 ± 12,7	83,0 ± 11,2	81,64
	- GSH	79,0 ± 10,1	79,8 ± 10,9	80,6 ± 11,0	78,81
	Rataan	80,00	80,36	81,82	
Ekulibrasi	+ GSH	80,9 ± 7,3	76,9 ± 5,7	75,6 ± 8,2	77,79
	- GSH	75,8 ± 6,0	75,7 ± 6,1	73,8 ± 8,2	75,09
	Rataan	79,00	77,07	77,00	
<i>Thawing</i> 0'	+ GSH	65,6 ± 7,4	57,6 ± 11,2	60,6 ± 10,3	61,29
	- GSH	63,2 ± 6,6	56,0 ± 6,3	67,1 ± 6,4	62,09
	Rataan	64,43 ^a	63,82 ^a	56,82 ^b	
<i>Thawing</i> 30'	+ GSH	65,3 ± 4,3	60,4 ± 4,0	58,8 ± 5,0	61,50 ^a
	- GSH	60,9 ± 4,7	58,9 ± 5,4	54,9 ± 5,2	58,19 ^b
	Rataan	63,07 ^a	59,61 ^b	56,86 ^c	

^{a,b,c} Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

- * BS0 = Tidak ada penggantian plasma semen
 BS50 = 50% plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
 BS100 = 100% Plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
 + GSH = Pengencer mengandung 1mM glutation
 - GSH = Pengencer tidak mengandung glutation

Tabel 6. Pengaruh glutation dan penggantian plasma semen kerbau terhadap persentase tudung akrosom utuh (%TAU) spermatozoa kerbau

Tahapan	Perlakuan	Plasma semen sapi*			Rataan
		BS0	BS50	BS100	
Pengenceran	+ GSH	79,8 ± 4,3	81,8 ± 4,1	81,4 ± 5,7	80,84
	- GSH	80,9 ± 4,2	79,9 ± 4,7	81,3 ± 5,3	80,69
	Rataan	80,32	80,50	81,32	
Ekuilibrasi	+ GSH	79,5 ± 5,6	79,3 ± 5,5	76,6 ± 5,3	78,48
	- GSH	74,6 ± 5,2	78,7 ± 5,4	77,4 ± 5,2	76,90
	Rataan	78,36	76,29	74,68	
Thawing 0'	+ GSH	67,8 ± 3,3	65,8 ± 4,7	61,5 ± 7,5	65,02
	- GSH	65,4 ± 5,2	65,3 ± 6,6	63,4 ± 6,2	64,67
	Rataan	66,57 ^a	65,53 ^a	62,43 ^b	
Thawing 30'	+ GSH	63,5 ± 2,4	60,9 ± 4,4	55,9 ± 5,7	59,81 ^a
	- GSH	60,0 ± 4,7	58,0 ± 3,9	54,1 ± 5,9	57,38 ^b
	Rataan	61,75 ^a	59,04 ^b	55,00 ^c	

^{a,b,c} huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama berbeda nyata (P < 0,05)

*

- BS0 = Tidak ada penggantian plasma semen
- BS50 = 50% plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
- BS100 = 100% plasma semen kerbau diganti plasma semen sapi
- + GSH = Pengencer mengandung 1mM glutation
- GSH = Pengencer tidak mengandung glutation

askorbatnya lebih tinggi (COCKRILL, 1974; BHATTACHARYA, 1974). Secara bertahap viabilitas semen menurun dengan menurunnya suhu, khususnya kualitas semen beku saat 30 menit setelah *thawing*, yang disimpan pada suhu 37°C, sangat menurun. Penggantian plasma semen secara signifikan menurunkan (P < 0,05) baik persentase motilitas, spermatozoa hidup, MPU dan TAU pada saat setelah *thawing* 30'. Hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan yang didapatkan oleh AMIN *et al.* (1999) yaitu penggantian 100% plasma semen menghasilkan viabilitas setelah *thawing* yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Hal ini dapat terjadi karena berbagai faktor, seperti variasi kualitas plasma semen sapi, kualitas awal dari semen kerbau, cara pengerjaan yang berbeda seperti perlakuan sentrifus pada saat memisahkan plasma semen, yang semuanya dapat mempengaruhi kualitas semen sebelum diproses untuk pembekuan. LODHI *et al.* (1998) melaporkan bahwa penggantian seluruh plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi dapat menurunkan kualitas sperma, namun penggantian setengah plasma semennya justru meningkatkan kualitas semen beku kerbau.

Kemungkinan hal tersebut karena adanya fakto *unknown* pada plasma semen kerbau yang berperan menjaga viabilitas spermatozoa kerbau dan akan berpengaruh buruk bila dihilangkan sama sekali (LODHI *et al.*, 1998).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini perlakuan tanpa penggantian plasma semen kerbau (BS0) memberikan kualitas semen beku kerbau terbaik, sebaliknya penggantian seluruhnya plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi justru dapat menurunkan kualitas semen beku kerbau.

Penambahan glutation meningkatkan kualitas semen pada setiap tahapan proses pembekuan, khususnya pada saat *thawing* 0 dan 30 menit.

Penambahan glutation (GSH) 1 mM dalam medium pengencer laktosa dan tanpa penggantian plasma semen kerbau dapat meningkatkan kualitas semen beku kerbau rawa dan menghasilkan *post thawing motility* (PTM) terbaik serta layak untuk diinseminasikan.

DAFTAR PUSTAKA

- AGRAWAL, Y.P. and T. VANHA-PERTULLA. 1988. Glutathione, L-glutamic acid and γ -glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. *Int. J. Androl.* 11: 123-131.
- AGARWAL, A., S. GUPTA and S. SIKKA. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 18: 325.
- AHMAD, M., A. KHAN, Z.A. SHAH and K.M. AHMAD. 1996. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. *J. Anim. Reprod. Sci.* 41: 193-199.
- AITKEN, R.J. and L. BENNETTS. 2006. Reactive oxygen species: friend or foe. *In: The Sperm Cell, Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.* DE JONGE, C.J. and C.L.R. BARRATT (Eds). Cambridge University Press.
- ALVAREZ, J.G., J.C. TOUCHSTONE, L. BLASCO and B. STOREY. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8: 338-138.
- AMIN, M.R. 1998. Efektivitas Plasma Semen Sapi dan Berbagai Pengencer dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*). Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- AMIN, M.R., R.T. M.R. TOELIHERE, L.Y. TUTY dan P. SITUMORANG. 1999. Pengaruh plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*). *JITV* 4: 143-147.
- ANDRABI, S.M.H. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 552-569.
- ASADPOUR, R., S.M. ALAVI-SHOUSHTARI, S. ASRI REZAI and M.H.K.H. ANSARI. 2007. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bull seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 308-313.
- BHATTACHARYA, P. 1974. Reproduction of Buffalo. Food and Agriculture Organization of United Nation, Rome.
- BILODEAU, J.F., S. BLANCHETTE, C. GAGNON and M.A. SIRARD. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*: 56: 275-286.
- BUCAK, M.N., A. ATESSAHIM and A. YÜCE, 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freezing-thawing process. *Small Rum. Res.* 75: 128-134.
- COCKRILL, W.R. 1974. The husbandry and health of domestic buffalo. Food and Agriculture Organization of United Nation, Rome.
- GADEA, J., M. MOLLA, E. SELLES, M.A. MARCO, F.A. GARCIA-VAZQUEZ and J.C. GARDON. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62: 40-46.
- GOYAL, R.L., R.K. TULI, G.C. GEORGIE and D. CHAND. 1996. Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or sephadex filtration. *Theriogenology* 46: 679-686.
- HALLIWELL, B. and M. WHITEMAN. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142: 231-255.
- HEROLD, F.C., J.E. AURICH and D.E. GERBER. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed1 and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental *Theriogenology* 61: 715-724.
- JAIN, Y.C. and S.R. ANAND. 1976. The lipids of buffalo spermatozoa and seminal plasma. *J. Reprod. Fert.* 47: 255-260.
- KANKOFER, M., G. KOLM, J. AURICH and C. AURICH. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 63: 1354-1365.
- KUSUMANINGRUM, D.A., P. SITUMORANG, E. TRIWULANNINGSIH dan R.G. SIANTURI. 2007. Penambahan Plasma Semen Sapi dan Anti Oksidan Glutathione untuk Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2007. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm.188-194.
- LEWIS, S.E.M. dan R.J. AITKEN. 2005. Sperm DNA damage, fertilization and pregnancy. *Cell Tissue* 322: 33-41.
- LI, T.K. 1975. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 40: 641-646.
- LODHI, L.A., Z.I. QURESHI, F.R. CHOCHAN, J. IQBAL and M. AHMAD. 1998. Effect of substitution of buffalo bull seminal plasma with that of cow bull on liveability and conception rate. *Pak. J. Biol. Sci.* 1: 402-404.
- MAIA, M.S., S.D. BICUDO, H.C. AZEVEDO, C.C. SICHERLE, D.B. SOUSA and L. RODELLO. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rum. Res.* 85: 85-90.
- MAIA, M.S., S.D. BICUDO, C.C. SICHERLE, L. RODELLO and I.C.S. GALLEGO. 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 118-123.

- MICHAEL, A.J., C. ALEXOPOULOS, E.A. PONTIKI, D.J. HADJIPAVLOU-LITINA, P. SARATSI, H.N. VERVERIDIS and C.M. BOSCO. 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 119-135.
- NAIR, J.S., A.S. BRAR, C.C. AHUJA, S.P.S. SANGHA and K.C. CHAUDHARY. 2006. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 21-29.
- SAHNI, K.L. and G. MOHAN. 1990. Effect of removal of plasma on preservation of bovine semen. *Ind. J. Anim. Sci.* 60: 783-785.
- SAS INSTITUTE INC. 2004. SAS/STAT[®] 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- STRADAIOLI, G. T. NORO, L. SYLLA dan M. MONACI. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* 67: 1249-1255.
- TREMELLEN, K. 2008. Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Human Reprod. Update* 14: 243-258.
- TRIWULANNINGSIH, E., P. SITUMORANG, T. SUGIARTI, R.G. SIANTURI dan D.A. KUSUMANINGRUM. 2003. Pengaruh penambahan glutathione pada medium pengencer sperma terhadap kualitas semen cair (*chilled semen*) *JITV* 8: 91-97.
- VALE, W.G. 2010. Deep freezing buffalo semen – state of art. Proc. 9th World Buffalo Congress. Buenos Aires, Brazil.
- VALKO, M., D. LEIBFRITZ, J. MONCOL, M.T. CRONIN, M. MAZUR and J. TELSER. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39: 44-84.