

MENINGKATNYA HIDROGEN PEROKSIDA PADA VARIAN T16189C mtDNA SEMEN MANUSIA

Sudjarwo

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga - Surabaya

ABSTRACT

Mitochondria are a site of cellular respiration through oxidative phosphorylation enzymatic reaction (OXPHOS), which is producing energy in the form of ATP (Adenosine Triphosphate). If abnormalities occur along cellular respiratory chain, ATP will decrease and Reactive Oxygen Species (ROS), will increase, one of which is hydrogen peroxide. ROS is an oxidation whose targets are lipid, protein and DNA, all of which may result in the decrease of spermatozoa motility. The detection of hydrogen peroxide was conducted by means of chemiluminescence using luminol, while the detection T16189C mtDNA variant was done using PCR-RFLP with restriction enzyme *MnII*. In normozoospermia, hydrogen peroxide in 16189T was 4.4 ± 1.8 CPM/ 10^6 sp and in 16189C was 6.4 ± 1.8 CPM/ 10^6 sp. In asthenozoospermia, hydrogen peroxide in 16189T was 20.3 ± 8.3 CPM/ 10^6 sp while in 16189C was 62.5 ± 9.0 CPM/ 10^6 sp. Hydrogen peroxide in normozoospermia and asthenozoospermia 16189T and 16189C showed significant difference ($p < 0.00$; $p < 0.01$). In normozoospermia and asthenozoospermia, 16189T and 16189C has correlation with the decrease of motile spermatozoa motility (normozoospermia, $p = 0.02$; $p < 0.05$; asthenozoospermia $p = 0.03$; $p < 0.05$)

Key words: hydrogen peroxide; T16189C mtDNA variant; sperm motility

PENGANTAR

Mitochondria adalah tempat terjadinya respirasi sel melalui reaksi enzimatik fosforilasi oksidatif (OXPHOS) menghasilkan suatu energi dalam bentuk *Adenosine Triphosphate* (ATP). Matriks di dalam mitokondria yang berfungsi sebagai respirasi sel disebut *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), DNA mitokondria tersebut dikenal dengan sebutan mtDNA. Di dalam mtDNA struktur organisasinya 93% merupakan daerah ekson dan 7% daerah intron. Dari 93% daerah ekson tersebut banyak terdapat gen, yaitu 37% gen yang terdiri dari 13 polipeptida, 2 rRNA dan 22 tRNA (Wallace, 1992; 1995). Daerah yang tidak menyandi (noncoding region) pada mtDNA disebut daerah gelung-D (D-loop), yang merupakan tempat awal terjadinya proses replikasi dan transkripsi (Wallace, 1992). Kecepatan mutasi mtDNA pada D-loop adalah 10–20 kali DNA inti (DNA), sehingga urutan DNA pada daerah D-loop ini sangat variatif (Horai and Hayasaka, 1990; Wallace, 1992; Brown and Wallace, 1993). Varian T16189C mtDNA terletak pada daerah D-loop, yang sering mempunyai hubungan dengan NonInsulin Dependent Diabetes Millitus (NIDDM) dan Mitochondria *Myopathy Encelopathy Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes* (MELAS) (Poulton *et al.*, 1998). Akibat adanya mutasi mtDNA di samping mengakibatkan menurunnya ATP, akan diperoleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) antara lain hidrogen peroksida yang tinggi (Scriver *et al.*, 1995; Sohal and Brunk, 1992; Cahill *et al.*, 1997; Richter, 1992). Sedangkan sifat dari hidrogen peroksida adalah oksidator, yang mana pada konsentrasi yang tinggi

akan mengoksidasi lipid, protein dan DNA (Sies and Menck, 1992; Holmes *et al.*, 1992; Ozawa, 1995; Suleiman *et al.*, 1996). Apabila hal ini terjadi pada spermatozoa dikawatirkan dapat menyebabkan menurunnya motilitas spermatozoa dikarenakan motilitas spermatozoa sangat membutuhkan ATP (Ruiz-Pesini *et al.*, 1998).

Pada penelitian ini akan dilakukan penentuan konsentrasi hidrogen peroksida pada semen manusia yang mengalami varian T16189C mtDNA yang mempunyai hubungan dengan motilitas spermatozoa. Sehingga nantinya akan dapat diketahui bahwa hidrogen peroksida merupakan faktor predisposisi menurunnya motilitas spermatozoa sebagai penyebab infertilitas.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Sampel semen diperoleh secara acak dari pasien yang datang rutin di Poli Infertilitas Rumah Sakit Budi Mulia, Surabaya untuk kontrol kualitas semen.

Bahan kimia yang dipakai yaitu: metanol, etanol, natrium asetat, asam sitrat, asam asetat mempunyai derajat kemurnian pro analisis (p.a), etilen diamin tetra asetat (EDTA), kloroform, fenol, natrium klorida (Merck), Tris base pH 8.0, *sodium dodecyl sulphate* (SDS), nuklease-P1, *alkaline phosphatase* (Sigma), *Horseradish Peroxidase* (Sigma); *Luminol* (Sigma); *Dimethyl sulfoxide* (DMSO, Sigma).

Alat gelas yang dipakai adalah alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium, *vortex Thermolyne Type 37600*

Mixer, sentrifus eppendorf (Centrifuge 5403 dan 5415), inkubator 37 °C (Forma Scientific), pipet eppendorf berbagai ukuran, DNA SEEDVAC (DNA 110), β -Counter Chemiluminicence (LKB, Flexivial).

Cara Kerja

Penentuan konsentrasi dan motilitas spermatozoa

Penentuan konsentrasi dan motilitas spermatozoa dilakukan menurut petunjuk laboratorium WHO (1992).

Penentuan hidrogen peroksida

Suspensi semen (0,2 ml) ditambahkan 4 μ l luminol (25 mM dalam DMSO = *Dimethyl Sulfoxide* dengan konsentrasi akhir 250 μ M), 8 μ l *horseradish peroxidase* (2 mg/ml dalam PBS) dan diamati khemiluminisensi selama satu menit (Aitken, 1993, 1994).

Isolasi DNA

Isolasi DNA semen dilakukan dengan metode Kao *et al.* (1995). Sperma dicuci dengan dua kali volum buffer fosfat pH 8.0 sebanyak tiga kali. Kemudian dilakukan *osmotic shock* dengan cara di inkubasi pada suhu 8 °C selama 20 menit. Pemecahan sel dengan cara ditambahkan 0,5 ml buffer lisis yang mengandung 2 ml buffer PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3 yang mengandung 50 mM KCl; 0,01% b/v gelatin); 0,6 ml MgCl₂ 50 mM; 1 ml Proteinase-K 20 mg/ml; 50 l DTT (Dithiothreitol) 20 mM dan 10 ml SDS (Sodium Dodecyl Sulphat) 0,1%. Campuran kemudian diinkubasi pada 37 °C semalam. Selanjutnya dilakukan inaktivasi Proteinase-K, dengan pemanasan pada 95 °C selama 10 menit, dan sentrifugasi pada 14.000 rpm selama tiga menit. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara penambahan fenol-kloroform. Pada campuran ditambahkan satu kali volum larutan fenol (dalam buffer Tris-HCl pH 8.0) dan pencampuran dengan menggunakan vortex, kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama tiga menit. Fase air dipindahkan pada tube lain dan ditambahkan satu kali volum fenol-kloroform (25:24), divortex dan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama tiga menit. Proses dilanjutkan dengan memindahkan fase air pada tube lain untuk kemudian ditambahkan satu kali volum kloroform, vortex dan sentrifuge lagi pada 12.000 rpm selama tiga menit, fase air dipindahkan pada tube lain dan ditambahkan 2,5 kali volum etanol (100%), campur dan diamkan pada -20 °C selama 10 menit. Presipitat DNA diperoleh pada 4 °C, 14.000 rpm selama 10 menit. DNA yang diperoleh dikeringkan dengan Vacum SPEEDVAC (DNA Speed Vac, DNA 110, Savant) dan dilarutkan dalam buffer TE (Tris-EDTA, pH 8.0).

Amplifikasi DNA semen dengan menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sebanyak kurang lebih 100 ng DNA semen hasil isolasi diamplifikasi dengan menambahkan 1,25 unit DNA Taq Polymerase (Pharmacia) pada volume akhir 50 l campuran reaksi yang mengandung larutan dapar amplifikasi (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl dan 0,01% gelatin), 15 mM MgCl₂, 200 IM dNTP, 40 pmol pasangan primer oligonukleotida sintetik (NioLab) yang sepsifik. Untuk menentukan varian T16189C digunakan pasangan primer L15904 5'CTAATACACCAGTCTTGTAACCGGAG3') dan H16540 (5'GTGGGC TATTTAGGCTTTATGACCCTG3'). Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan suhu inkubasi 95 °C selama 20 detik untuk tahap denaturasi, 62 °C selama 20 detik untuk tahap *annealing* dan 72 °C selama 60 detik untuk tahap ekstensi. DNA yang telah diamplifikasi kemudian dideteksi secara elektroforesis pada 1,5% gel agaros dengan voltase 100V selama 30 menit dan diwarnai dengan etidium bromida. Visualisasi mobilitas DNA dilakukan dengan membandingkan DNA standar yang dibuat dari DNA lambda phage yang dipotong dengan HaeIII (Gibco BRL) menggunakan sinar ultra violet (Gel Doc 1000, BioRad).

Penentuan varian T16189C mtDNA dengan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Analisis RFLP dilakukan dengan digesti kurang lebih 1 lg fragmen DNA yang telah diamplifikasi dengan menggunakan enzim restriksi *MnLI*. Digesti dilakukan pada suhu 37 °C selama semalam (14–18 jam). Hasil digesti pada masing-masing fragmen mtDNA dipisahkan secara elektroforesis pada 3% gel agaros yang diwarnai etidium bromida pada 80V selama 90 menit. Visualisasi hasil digesti fragmen DNA dilakukan dengan membandingkan DNA standart yang dibuat dari DNA lambda phage yang dipotong dengan *HaeIII* (Gibco BRL) menggunakan sinar ultra violet (Gel Doc 1000, BioRad).

Analisis data

Uji beda makna digunakan uji t-test (Microsoft Excel).

HASIL

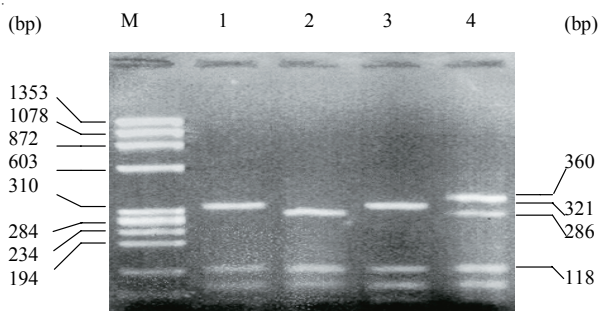
Dari 50 sampel semen yang diambil secara acak, setelah dilakukan analisis rutin kualitas semen menurut WHO (1992) terdiri dari 14 asthenospermia dan 36 normozoospermia.

Analisis varian T16189C mtDNA dilakukan dengan metode PCR-RFLP dengan menggunakan enzim restriksi *MnLI* pada fragmen mtDNA sepanjang 636 pb dengan

menggunakan pasangan primer L15904–H16540. Ada dan tidaknya situs restriksi ditentukan oleh ukuran fragmen mtDNA yang di digesti dengan enzim restriksi. Apabila fragmen hasil digesti hanya memperlihatkan ukuran yang sama dengan hasil PCR, maka fragmen mtDNA tersebut tidak mempunyai situs pengenalan untuk enzim tersebut. Hal ini dapat terjadi pada fragmen DNA yang daerah pengenalan enzim mengalami mutasi, sehingga situs enzim menjadi tidak dikenali atau kehilangan situs restriksi (site loss). Hasil dinyatakan dengan tanda (+) dan (-). Tanda (+) menunjukkan pada fragmen mtDNA yang diperiksa terdapat varian (mutasi) sepanjang 118 dan 321 pb (Gambar 1 lajur 1 dan 3), sedangkan tanda (-) menunjukkan sebaliknya sepanjang 286 dan 118 pb (Gambar 1 lajur 2). Heteroplasmia diperoleh bila fragmen mtDNA sepanjang 118; 286 dan 360 pb (Gambar 1 lajur 4).

Hasil analisis varian T16189C mtDNA dengan menggunakan metode PCR-RFLP tersebut di atas adalah: dari 14 sampel semen asthenozoospermia yang mengalami 16189C sebanyak 7 sampel, dan 16189T sebanyak 7 sampel. Pada normozoospermia (N = 36 sampel), yang mengalami 16189C sebanyak 19 sampel, sedangkan yang lain 17 sampel 16189T (Seperti Tabel 1)

Penentuan hidrogen peroksida pada normozoospermia 16189T = $4,4 \pm 1,8$ CPM/ 10^6 sp; 16189C = $6,4 \pm 1,8$ CPM/ 10^6 sp. Sedangkan pada asthenozoospermia 16189T = $20,3 \pm 8,3$ CPM/ 10^6 sp; 16189C = $62,5 \pm 9,0$ CPM/ 10^6 sp. (Tabel 1)



Gambar 1. Hasil PCR-RFLP varian T16189C mtDNA pada sampel semen dengan menggunakan enzim restriksi *MnI*. Lajur M: Marker DNA *vX174/HaeIII* (Gibco BRL); lajur 1: (+, positif) varian T16189C mtDNA pada normozoospermia; lajur 2: (-, negatif) varian T16189C mtDNA pada normozoospermia; lajur 3: (+, positif) varian T16189C mtDNA pada asthenozoospermia; dan lajur 4: (+/-, positif/negatif; heteroplasmia) varian T16189C mtDNA asthenozoospermia.

Untuk (%) motilitas spermatozoa motil, pada normozoospermia 16189T = $69,9 \pm 8,2$; 16189C = $64,3 \pm 7,7$. Sedangkan pada asthenozoospermia 16189T = $30,6 \pm 6,0$; 16189C = $23,4 \pm 4,6$.

Tabel 1. Hidrogen peroksida dan motilitas spermatozoa motil di dalam semen manusia

| Diagnosa klinik | H ₂ O ₂ (CPM/ 10^6 sp) | (%) Motilitas spermatozoa motil |
|----------------------------------|--|---------------------------------|
| Asthenozoospermia 16189T (N = 7) | $20,3 \pm 8,3$ * | $30,6 \pm 6,0$ ^{a)} |
| Asthenozoospermia 16189C (N = 7) | $62,5 \pm 9,0$ * | $23,4 \pm 4,6$ ^{a)} |
| Normozoospermia 16189T (N = 17) | $4,4 \pm 1,8$ ** | $69,9 \pm 8,2$ ^{b)} |
| Normozoospermia 16189C (N = 19) | $6,4 \pm 1,8$ ** | $64,3 \pm 7,7$ ^{b)} |

perbedaan bermakna: *) dan **) $p=0,00$ ($p < 0,01$); ^{a)} $p = 0,03$ ($p < 0,05$) dan ^{b)} $p = 0,02$ ($p < 0,05$)

PEMBAHASAN

Pada analisis varian T16189C mtDNA, sampel semen normozoospermia diperoleh hasil positif varian T16189C (16189C) mtDNA. Hal ini karena sampel semen normospermia maupun asthenozoospermia terdiri dari campuran motilitas spermatozoa, tanpa dipisahkan terlebih dahulu motilitas spermatozoa.

Varian T16189C mtDNA adalah bagian mtDNA yang sangat variabel, mengandung homopolimerik sitosin antara nt 16184–16193 (Bendall and Sykes, 1995). Diversitas genom manusia merupakan faktor predisposisi terhadap suatu penyakit, seperti faktor genetik mitokondria pada patogenesis suatu penyakit. Varian tersebut di atas berhubungan dengan kelainan metabolisme energi pada mitokondria melalui suatu proses respirasi fosforilasi oksidatif (OXPHOS). Varian T16189C mtDNA tersebut merupakan keadaan patologis yang dapat menambah pengetahuan tentang patomekanisme suatu penyakit (Marzuki, 2001). Penurunan fungsi OXPHOS berhubungan dengan gangguan replikasi, yang akhirnya menyebabkan jumlah ATP menurun (Brown and Wallace, 1993). Hal ini jika terjadi pada spermatozoa akan mengakibatkan penurunan motilitas.

Pada penentuan konsentrasi hidrogen peroksida, pada normozoospermia maupun asthenozoospermia 16189T dengan 16189C terjadi perbedaan peningkatan yang bermakna ($p = 0,00$; $p < 0,01$), seperti (Tabel 1). Dapat dijelaskan bahwa adanya varian T16189C mtDNA mempunyai hubungan dengan meningkatnya total hidrogen peroksida (intra dan ekstra seluler).

Sebagian besar faktor kelainan mitokondria diakibatkan gangguan OXPHOS yang dapat menstimulasi terbentuknya senyawa oksigen reaktif antara lain hidrogen peroksida dan mengakibatkan kerusakan mtDNA. Gejala gangguan mitokondria menghasilkan dua efek patofisiologi dari defisiensi OXPHOS: pertama menurunnya produksi energi

(ATP dan yang kedua meningkatnya produksi dan toksisitas dari senyawa oksigen reaktif termasuk hidrogen peroksida. Mitokondria adalah salah satu sumber utama senyawa oksigen reaktif endogen, antara lain hidrogen peroksida (Esposito *et al.*, 1999; Melov S *et al.*, 1999).

Sifat ROS adalah oksidator, di mana dalam kadar yang tinggi akan mengoksidasi DNA (Sai *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.* 1995; Kasai and Nishimura 1984; Chung, and Xu 1992). Dalam kondisi fisik normal oksidan diproduksi oleh semen (Alvarez and Storey 1989; Alvarez *et al.*, 1987; Aitken and Clarkson 1987; Ruiz-Pesini *et al.*, 1998). Seperti yang dilaporkan oleh McLeod (1943), bahwa oksidan yang tinggi bersifat toksik terhadap semen yang dapat berpengaruh terhadap motilitasnya. Motilitas spermatozoa adalah salah satu faktor penyebab terjadinya infertilitas pria.

Persen (%) motilitas spermatozoa motil (%) pada normozoospermia 16189T dengan 16189C terjadi perbedaan penurunan yang bermakna ($p = 0,02$; $p < 0,05$), sedangkan pada asthenozoospermia 16189T dengan 16189C terjadi perbedaan penurunan yang bermakna ($p = 0,03$; $p < 0,05$), seperti (Tabel 1). Hal ini dapat dijelaskan bahwa, adanya varian T16189C mtDNA mempunyai hubungan dengan persen (%) menurunnya motilitas spermatozoa motil.

Penurunan motilitas berhubungan dengan tersedianya energi. Varian T16189C mtDNA terletak di D-loop yang mana merupakan tempat awal terjadinya replikasi. Sehingga adanya varian T16189C mtDNA, mengakibatkan proses replikasi terganggu dan akhirnya kopi mitokondria berkurang yang selanjutnya energi yang dihasilkan dari respirasi di mitokondria menurun (Brown and Wallace, 1993). Energi merupakan faktor penting yang diperlukan untuk motilitas spermatozoa (Ozawa, 1995; Ruiz-Pesini *et al.*, 1998).

Tingginya konsentrasi hidrogen peroksida pada semen dengan varian T16189C mempunyai hubungan dengan menurunnya motilitas spermatozoa motil.

Pada semen dengan hidrogen peroksida yang tinggi dapat diberikan antioksidan dengan tujuan menurunkan hidrogen peroksida, dan efek lain meningkatkan motilitas spermatozoa motil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih ini kami sampaikan kepada Lembaga Biologi Molekul Eijkmann, Jakarta dan Makmal Endokrinologi Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo, Surabaya yang telah memberikan fasilitas laboratorium sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

KEPUSTAKAAN

- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW, 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa, *Molecular Reproduction and Development*, 35: 302–315.
- Aitken RJ, Krausz C, dan Buckingham D, 1994. Relationship between biochemical marker for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions; *Molecular Reproduction and Development*, 39: 268–279.
- Aitken RJ dan Clarkson JS, 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa; *Journal of Reproduction and Fertilization*, 81: 459–469.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco I, Storey BT, 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 8: 338–348.
- Alvarez JG dan Storey BT, 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation; *Gamete Research*, 23: 77–90.
- Bendall KE dan Skyes BC, 1995. Length heteroplasmy in the the first hypervariable segment of the human mtDNA control region, *American Journal of Human Genetic*, 57(2): 248–256.
- Brown MD dan Wallace DC, 1993. Genetic approaches to mitochondria DNA disease of oxidative phosphorylation. In Lash LH and Jones DP, eds. *Methods in toxicology mitochondria dysfunction*; Academic Press. Inc. California, 2: 416–427.
- Cahill A, Wang X, dan Hoek JB, 1997. Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235: 286–290.
- Chung FL dan Xu Y, 1992. Increased 8-oxodeoxyguanosine levels in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *Carcino-genesis*, 13: 1269–1272.
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA dan Wallace DC, 1999. Mitochondria disease in mouse results in increased oxidative stress, *Proceeding of National Academic Science, USA*, 96: 4820–4825.
- Hasegawa R, Chujo T, Sai-Kato K, Umemura T, Tanimura A, dan Kurokawa Y, 1995. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane, *Food Chemistry and Toxicology*, 33(11): 961–970.
- Holmes GE, Bernstein C, dan Berstein H, 1992. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review, *Mutation Research*, 275: 305–315.

- Horai S dan Hayasaka K, 1990, Intraspecific nucleotide sequence difference in the major noncoding region of human mitochondria DNA, *American Journal of Human Genetic*, 46, 828–842.
- Kao SH, Chao HT, Wei YH, 1995. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm, *Biology of Reproduction*, 52: 7129–736.
- Kasai H dan Nishimura S, 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucleic Acids Research*, 12: 2137–2145.
- Marzuki S, 2001. Genetic diversity and human disease; *imbn.org/session_ihtr*.
- McLeod J, 1943. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa, *American Journal of Physiology*, 138: 512–518.
- Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrel B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang T, Mizioroko H, Epstein CJ, dan Wallace DC, 1999. Mitochondria disease in superoxide dismutase 2 mutant mice, *Proceeding of National Academic Science, USA*, 96, 846–851.
- Ozawa T, 1995, Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271: 177–189.
- Poulton J, Brown MS, Cooper A, Marchington DR, dan Phillips, 1998, A Common mitochondria DNA variant is associated with insulin resistance in adult life, *Diabetologia*, 41: 54–58.
- Richter C, 1992. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria, *Mutation Research*, 275: 249–255.
- Ruiz-Pesini E, Diaz C, Lapena AC, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J dan Lopez-Perez MJ, 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities, *Clinical Chemistry*, 44, 8, 1616–1620.
- Sai K, Umemura T, Takagi A, Hasegawa R dan Kurokawa Y, 1992, The protective role of glutathione, cysteine and vitamin C against oxidative DNA damage induced in rat kidney by potassium bromate, *Japanese Journal of Cancer Research*, 83: 45–51.
- Sciver MDCM, Beaudet A, Sly W, Valle D, Stanbury J, Wyngaarden J, Fredrickson D, 1995. The metabolic and molecular bases of inherited Disease, Seventh edition, I, International Edition, McGraw-Hill, Inc., New York; 1535–1583.
- Sies dan Menck, 1992. Singlet oxygen induced DNA damage, *Mutation Research*, 275: 367–375.
- Sohal RS dan Brunk UT, 1992. Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence, *Mutation Research*, 275: 295–304.
- Suleiman SA, Ali M, Zaki ZMS, El-Malik EMA, dan Nasr MA, 1996. Lipid peroxidation and human sperm motility: Protective role of vitamin E, *Journal of Andrology*, 17: 530–537.
- Wallace DC, 1992. Mitochondria genetics a paradigm for aging and degenerative diseases?, *Science*, 2556, 628–632.
- Wallace DC, 1995, Mitochondria disease and aging, *Progress of Cellular Research*, 5: 249–252.
- World Health Organization, 1992. *WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Third Edition, Cambridge University Press. New York.
- Xu Y, Ho C, Amin S. G, Han C, dan Chung F, 1992, Inhibition of Tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants, *Cancer Research*, 52(15): 3875–3879.

Reviewer: **Drs. Win Darmanto, M.Si., PhD.**