

TESIS

**PENGARUH BERBAGAI JENIS KUNING TELUR SEBAGAI
BAHAN BAKU MEDIUM TERHADAP MOTILITAS,
VITALITAS DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA MANUSIA
SELAMA PROSES SIMPAN BEKU**

*Effect of various egg yolks in cryopreservation medium
on motility, vitality and morphology
of cryopreserved human spermatozoa*



M. ANWAR DJAELANI

G4A098006

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2001**

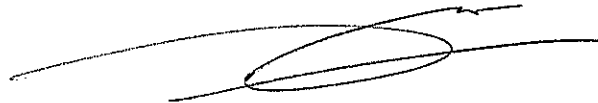
UPT-PUSTAR-UNSG

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini telah diujikan pada tanggal 14 Agustus 2001

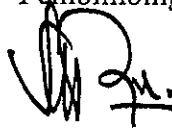
Menyetujui

Pembimbing I



Dr.dr. SUSILO WIBOWO, MS.Med. Sp.And.
NIP. 130881984

Pembimbing II



Prof. Dr. dr: SARJADI, Sp. PA.
NIP. 130352547

Pembimbing III

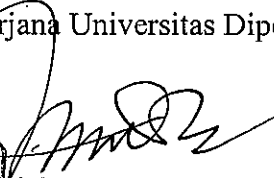


dr. HUDI WINARSO, M.Kes. Sp. And.
NIP. 131653739

Mengetahui

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik

Program Pascasarjana Universitas Diponegoro



Prof. dr. H. SOEBOWO, Sp. PA.
NIP. 130352549

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul “Pengaruh berbagai kuning telur sebagai bahan baku medium terhadap motilitas, vitalitas, dan morfologi spermatozoa manusia selama proses simpan beku”.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor, Dekan FMIPA, Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Diponegoro yang telah memberikan ijin pada penulis untuk mengikuti studi lanjut di Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro
2. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti studi lanjut di Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro
3. Prof. dr.H. Soebowo, Sp.PA., selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, yang telah mengasah dan mengasuh selama penulis menuntut ilmu di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro
4. DR.Dr. Susilo Wibowo, MS Med, Sp. And., selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, tenaga serta pikiran dalam membimbing penyusunan tesis ini

5. Prof. DR. Dr. Sarjadi, Sp. PA., selaku pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga serta pikiran dalam membimbing penyusunan tesis ini
6. Dr. Hudi Winarso, M. Kes, Sp. And., selaku pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga serta pikiran baik dalam melatih pelaksanaan penelitian maupun dalam membimbing penulisan tesis, serta pemberian bantuan bahan kimia yang penulis perlukan selama penelitian
7. Para donatur yang telah merelakan semennya untuk digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini
8. Tim Penguji Proposal maupun Tim Penguji Tesis yang telah berkenan memberikan masukan demi kesempurnaan isi tesis ini
9. Direktur beserta Staf Laboratorium Andrologi RS Telogorejo Semarang yang telah memberikan fasilitas sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dengan baik.
10. DR. Dita Prameswari, atas bantuan dana yang diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian.
11. Dr. Dwi Pujonarko, M Kes, selaku konsultan yang dengan keikhlasan mengulurkan tangan serta pemikiran selama penulis menyusun tesis
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT memberikan pahala yang setimpal dengan kebaikan yang penulis terima dan semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Semarang, Juli 2001

Penulis,

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT	x
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Masalah Penelitian	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Prinsip Simpan Beku Semen	6
2.2. Tinjauan Umum Morfologi, Motilitas dan Vitalitas Spermatozoa Manusia.....	11
2.3. Parameter Semen Yang Umum Diamati Sebelum dan Sesudah Simpan Beku.....	13
2.4. Komposisi Kimia Telur	17
2.5. Kerangka Teori	20
2.6. Kerangka Konsep	23

III. HIPOTESIS PENELITIAN.....	24
IV. METODE PENELITIAN.....	25
4.1. Rancangan Penelitian	25
4.2. Kerangka Penelitian	25
4.3. Sampel Penelitian.....	26
4.4. Parameter Yang Diamati	26
4.5. Variabel Penelitian	27
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	28
4.7. Bahan Penelitian	28
4.8. Alat Penelitian	29
4.9. Alur Kerja Penelitian	31
4.10. Cara Penelitian	32
4.11. Cara Pengumpulan Data	37
4.12. Analisa Data	39
V. HASIL PENELITIAN.....	40
VI. PEMBAHASAN.....	47
VII.KESIMPULAN DAN SARAN	65
7.1. KESIMPULAN.....	65
7.2. SARAN.....	65
VIII. RINGKASAN	66
DAFTAR PUSTAKA.....	69
LAMPIRAN.....	74

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Hasil penghitungan rerata data screening kriteria inklusi	40
Tabel 2.	Hasil penghitungan <i>cryosurvival factor</i> spermatozoa (dalam %)...	40
Tabel 3.	Hasil penghitungan rerata motilitas spermatozoa (dalam%) sebelum perlakuan, setelah penambahan medium simpan beku, dan setelah simpan beku	41
Tabel 4.	Hasil penghitungan rerata vitalitas spermatozoa (dalam%) sebelum perlakuan, setelah penambahan medium simpan beku, dan setelah simpan beku	43
Tabel 5.	Hasil penghitungan rerata morfologi spermatozoa (dalam%) sebelum perlakuan, setelah penambahan medium simpan beku, dan setelah simpan beku	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Histogram rata-rata motilitas, vitalitas dan morofologi spermatozoa sebelum perlakuan, setelah penambahan medium simpan beku, dan setelah simpan beku	45
---	----

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh dari berbagai kuning telur dalam medium simpan beku pada motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa manusia dengan membandingkan perbedaan motilitas, vitalitas, dan morfologi spermatozoa yang disimpan beku dengan menggunakan medium *modified TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) dengan kuning telur ayam, kuning telur bebek, kuning telur angsa dan medium *modified TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) tanpa kuning telur. Sampel yang digunakan pada penelitian ini berasal dari 30 pria dewasa yang dikoleksi dengan cara masturbasi setelah abstinensi selama 3 - 5 hari. Parameter yang diamati meliputi motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa. Seluruh sampel kemudian dibagi menjadi 4 kelompok dan ditambahkan medium m-TESTYC tanpa kuning telur (blanko) sebagai kontrol (perlakuan A), medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam (perlakuan B), medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek (perlakuan C), medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa (perlakuan D). Penambahan medium dengan perbandingan 1 : 1. Semua sampel disimpan dalam nitrogen cair pada suhu - 196 °C selama 2 minggu, kemudian dilakukan *thawing* pada temperatur kamar. Setelah dilakukan *thawing* motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa segera diamati. Rancangan penelitian ini menggunakan *Randomized pre-test and post-test control group design*. Data yang terkumpul diuji dengan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney U. Pada penelitian ini hasil tuaian spermatozoa yang disimpan beku dalam medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam dapat mempertahankan motilitas dan vitalitas tertinggi dari seluruh kelompok perlakuan, sedang morfologi spermatozoa *post freezing* ternyata tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan.

ABSTRACT

The present study were conducted to evaluate effect of various egg yolks in cryopreservation medium on motility, vitality and morphology of human spermatozoa by comparing differences motility, vitality, and morphology of spermatozoa that cryopreserved in *modified TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) medium with hen's egg yolk, duck's egg yolk, goose' egg yolk, and *modified TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) without egg yolk. Semen were collected by masturbation after 3 - 5 days abstinences from 30 adult males. The parameters taken into consideration were motility, vitality, and morphology of spermatozoa. All of the sample were divided into four groups. First group was added with m-TESTYC medium without egg yolk (as control group/A group), second group was added with m-TESTYC which contain hen's egg yolk (as B group), third group was added with m-TESTYC which contain duck's egg yolk (as C group), fourth group was added with m-TESTYC which contain goose's egg yolk (as D group). Ratio of medium and semen samples were 1 : 1. The samples were plunged into liquid nitrogen at - 196 °C and stored for two weeks and then removed from the liquid nitrogen and thawed at room temperature. Motility, vitality and morphology of the spermatozoa after thawed were examined immediatly. The study was adapts to randomized pre-test and post test control group design. Data were analyzed with Kruskal Wallis and Mann-Whitney U test. The results showed motility and vitality of the spermatozoa that cryopreseved in m-TESTYC medium with hen's egg yolk (B group) was the highest, but there were not significantly difference on morphology of the post freezing spermatozoa among treatment groups.

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Simpan beku semen (*semen cryopreservation*) merupakan penyimpanan semen pada suhu sangat rendah dalam nitrogen cair. Sebelum dilakukan penyimpanan, terlebih dahulu semen dicampur dengan medium simpan beku. Simpan beku semen digunakan untuk menanggulangi masalah dalam reproduksi, antara lain untuk menanggulangi tindakan medis yang memungkinkan terjadinya penurunan kuantitas dan kualitas spermatozoa misalnya kemoterapi pada kasus keganasan. Simpan beku juga merupakan tindakan pengamanan terhadap spermatozoa sebelum vasektomi karena kemungkinan terjadinya antibodi antisperma setelah vasektomi yang berdampak pada terganggunya kesuburan. Simpan beku semen juga dilakukan pada keadaan oligozoospermia yang dengan tuaian secara kolektif akan didapatkan jumlah spermatozoa yang lebih banyak. Simpan beku juga diperlukan sebagai sarana pendukung (*back up*) laboratorium teknik bantu reproduksi (*Assisted Reproductive Techniques/ART*).¹

Hal yang perlu dipertimbangkan dalam simpan beku semen adalah pemilihan medium simpan beku. Medium yang digunakan untuk simpan beku semen tidak selalu sama mengingat adanya variabilitas dari spermatozoa. Medium yang digunakan pada simpan beku semen antara lain adalah *Human Sperm Preservation Medium* (HSPM), medium ini tidak menggunakan kuning telur sebagai bahan baku.² Penelitian Critzer tahun 1988 dengan menggunakan medium HSPM menunjukkan motilitas spermatozoa *post freezing* dapat

dipertahankan 70 % dibanding motilitas spermatozoa *pre freezing*.³ Medium lain yang juga banyak digunakan adalah *glyserol-egg-yolk-citrate* (GEYC) yang disusun oleh Ackerman dengan menggunakan gliserol dan Na-sitrat yang ditambah dengan kuning telur ayam.² Medium ini banyak digunakan karena medium ini relatif sederhana sehingga biayanya murah dan mudah didapat. Motilitas spermatozoa *post freezing* dapat dipertahankan antara 40% - 60 % dibanding motilitas spermatozoa *pre freezing* bila disimpan beku menggunakan medium GEYC.⁴ Graham menyempurnakan medium GEYC ini dengan menambahkan *Zwitterion buffer system* yang tersusun atas n-tris (*hydroxymethyl*) methyl 2-amino ethana asam sulfonat (TES) dan *hydroxymethyl amino methana* (TRIS) sebagai tambahan. Medium ini kemudian dikenal sebagai medium *TES-Tris yolk citrat* (TESTYC).⁴ Penelitian Prins & Weidel tahun 1986 menunjukkan medium TESTYC dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* 83 % dari *pre freezing*.⁵

Kuning telur ayam merupakan salah satu komponen medium TESTYC yang bersama dengan gliserol berfungsi sebagai protektor membran.² Penelitian Weidel & Prins tahun 1987⁴ menunjukkan pada medium yang terdiri atas kuning telur ayam dan gliserol dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* 49% dibanding motilitas spermatozoa *pre-freezing*. Medium dengan gliserol saja dapat mempertahankan spermatozoa *post-freezing* 31 % dibanding motilitas spermatozoa *pre-freezing*.⁴ Struktur dan fungsi spermatozoa *post freezing* yang disimpan dengan medium TESTYC lebih baik dibanding struktur dan fungsi spermatozoa *post freezing* yang disimpan dengan gliserol saja, hal ini

disebabkan adanya penambahan kuning telur dan *zwitterion buffer* pada medium TESTYC.⁶ Medium GEYC maupun TESTYC selalu menggunakan kuning telur ayam,² namun tidak dikemukakan mengapa kuning telur ayam yang digunakan dan bukan jenis kuning telur yang lain.

Komponen kuning telur unggas yang dominan setelah air adalah lemak, yang bervariasi kuantitasnya menurut jenisnya. Kandungan lemak dalam kuning telur ayam 32,6 %, kuning telur bebek 35,2 % sedangkan kuning telur angsa 36 %.⁷ Gliserida merupakan komponen tertinggi penyusun lemak kuning telur. Gliserida pada kuning telur tersusun atas gliserol dan asam lemak.⁷ Gliserol merupakan *cryoprotectant* yang paling umum pada simpan beku semen manusia.² Disamping itu, di dalam lemak kuning telur juga terdapat kolesterol yang dapat mempertahankan fluiditas membran sel sehingga mencegah kerusakan sel akibat penurunan suhu.^{8,9} Kuning telur angsa secara matematis memiliki kandungan gliserol, asam lemak dan kolesterol tertinggi dibandingkan dengan kuning telur bebek atau kuning telur ayam, sehingga dimungkinkan akan lebih baik bila digunakan sebagai bahan baku medium modifikasi dari *TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) yang dapat mempertahankan motilitas, vitalitas, dan morfologi *spermatozoa post freezing*.

1.2. Masalah Penelitian

Melihat pentingnya peran kuning telur dalam mempertahankan fluiditas membran sel selama proses simpan beku berlangsung dan berdasarkan adanya perbedaan jumlah penyusun lemak kuning telur pada angsa, bebek, dan ayam,

maka dimungkinkan adanya perbedaan pengaruh ketiga jenis kuning telur tersebut jika dipakai sebagai bahan baku medium *modified TES Tris Yolk Citrat* (m-TESTYC) yang merupakan modifikasi dari medium *TES Tris Yolk Citrat* (TESTYC) terhadap motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa. Hal tersebut menimbulkan permasalahan medium m-TESTYC dengan bahan baku jenis kuning telur apakah yang dapat mempertahankan motilitas, vitalitas, dan morfologi spermatozoa manusia *post freezing* tertinggi ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mencari bahan baku yang sesuai untuk medium simpan beku semen dengan bahan-bahan yang didapat di Indonesia, yang selanjutnya diamati pengaruhnya terhadap motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa manusia *post freezing*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Mengevaluasi perbedaan motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa manusia *post freezing* yang disimpan beku dalam nitrogen cair antara menggunakan medium m-TESTYC tanpa kuning telur dan medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam, kuning telur bebek, dan kuning telur angsa.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan :

1. Memberikan informasi tentang penggunaan berbagai jenis kuning telur sebagai bahan baku medium simpan beku spermatozoa manusia.
2. Memberikan dasar penggunaan kuning telur dari jenis tertentu sebagai bahan baku medium simpan beku bagi spermatozoa manusia.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Prinsip simpan beku semen (*semen cryopreservation*)

Prinsip utama pada penyimpanan sel hidup dengan cara pembekuan adalah mengontrol pergerakan molekul. Jika air di dalam protoplasma sel hidup membeku pada temperatur rendah, maka gerakan molekul akan terhenti. Jika sistem biologi dapat diaktifkan kembali melalui penghangatan tanpa kerusakan komponen sel, maka kehidupan sel sebenarnya dapat dipertahankan pada keadaan mati suri (*suspended animation*).²

Saat terjadi pembekuan, medium disekeliling sel membeku pada temperatur antara -5 °C sampai -15 °C.^{10,11} Keberadaan membran sel dapat berfungsi mencegah berkembangnya kristal es ekstrasellular ke arah intrasellular menyebabkan air intrasellular tidak membeku dan mengalami *supercooled*.¹¹ Potensial kimia air yang mengalami *supercooled* lebih tinggi daripada potensial kimia air yang membeku di luar sel. Hal tersebut menyebabkan air berdifusi keluar sel.^{10,12} Hal tersebut menyebabkan potensial kimia air intrasellular menembus membran, yang selanjutnya gradien potensial kimia air menurun secara cepat seiring dengan pelepasan panas laten sehingga menyebabkan temperatur intrasellular dan ekstrasellular menyatu sampai mencapai titik beku.¹²

Kecepatan keluarnya air dari sel tergantung pada beberapa faktor yang berbeda antara sel satu dengan sel yang lain. Faktor tersebut berupa permeabilitas membran sel terhadap air (L_p), energi aktivasi yang diperlukan agar membran menjadi permeabel terhadap air (δH), dan rasio luas permukaan/volume sel

(SA/V). Sel mamalia umumnya memiliki permeabilitas membran terhadap air berkisar $0,43 \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{m} \cdot \text{atm.}$, namun spermatozoa memiliki permeabilitas membran terhadap air lebih tinggi dari nilai tersebut, sehingga menyebabkan spermatozoa lebih cepat mengalami pembengkakan selama proses rehidrasi pada saat *thawing*.¹³

Pendinginan merupakan faktor fisik yang dapat menyebabkan mikrotubulus mengalami kerusakan dan berakibat terhentinya gerakan cilia.¹⁴ Menurut pendapat Neischlag & Behre tahun 1996,¹⁵ kurangnya lengan *dynein* pada mikrotubulus dapat menyebabkan motilitas spermatozoa mengalami penurunan. Proses pendinginan juga mengakibatkan membran sel spermatozoa yang bersifat fluid berubah menjadi *rigid* atau kaku dan akan menyebabkan proses transport melalui membran terhenti.^{8,16,17} Ketika titik beku dicapai, air intrasellular yang tidak sempat keluar sel, akan membeku di dalam sel dan membentuk kristal es yang berukuran kecil sebagai materi yang kompak.^{11,13} Kristal es intrasellular ini saat penghangatan kembali (*thawing*) akan beragregasi dan dapat menyebabkan kematian sel.¹²

Kecepatan pendinginan yang terlalu lambat menyebabkan dehidrasi berlangsung lama yang berakibat sel akan mengalami pengkerutan. Kecepatan pendinginan yang tinggi dapat mengakibatkan kerusakan membran sel dan membran organella.¹¹ Kecepatan optimum untuk pendinginan spermatozoa berkisar antara $0,5 - 5 \text{ }^\circ\text{C}$ per menit.⁴ Pada tahun 1999, Yogev melakukan penyimpanan semen dalam *straw*, yang didinginkan secara bertingkat mulai suhu kamar sampai $-6 \text{ }^\circ\text{C}$ dengan kecepatan $1,7 \text{ }^\circ\text{C}/\text{menit}$, kemudian diturunkan lagi

sampai mencapai $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan akhirnya disimpan pada temperatur -196°C .¹⁸ Critzer pada tahun 1987 melakukan penyimpanan semen dengan kecepatan penurunan suhu $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai mencapai $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, sebelum ditempatkan pada nitrogen cair.¹⁰ Winarso pada tahun 1999 melakukan penyimpanan semen dengan laju penurunan suhu $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ untuk mendapatkan hasil tuaian yang terbaik.¹ Kecepatan pendinginan sekitar $25 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ akan menyebabkan terbentuknya kristal es intrasellular yang mengakibatkan kerusakan spermatozoa tikus.¹⁹ Hal yang sama juga terjadi pada spermatozoa manusia, tetapi juga tergantung pada konsentrasi dan jenis medium.²⁰ Simpan beku semen dapat dilakukan dengan *dry ice* pada temperatur sekitar -78°C ,² tetapi temperatur akhir yang paling aman untuk menjaga potensi spermatozoa selama simpan beku adalah -196°C pada nitrogen cair,^{1, 4, 18} karena pada suhu tersebut semua proses biologis sel akan berhenti.¹³

Yogev pada tahun 1999, melakukan *thawing* dengan menempatkan *straw* pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit.¹⁸ Selanjutnya, penelitian Weidel & Prins tahun 1987 menunjukkan bahwa penyimpanan semen dalam *straw* tidak menunjukkan hasil tuaian yang berbeda apabila dihangatkan pada air $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ atau dibiarkan pada udara terbuka dengan temperatur $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁴

Upaya untuk mempertahankan agar spermatozoa tidak mengalami kerusakan selama simpan beku, adalah dengan cara menambah semen dengan medium tertentu sebelum dilakukan simpan beku. Medium simpan beku spermatozoa umumnya mengandung buffer dan *cryoprotectant*. Medium *TES-Tris yolk citrat* (TESTYC) merupakan medium yang sering digunakan pada simpan

beku spermatozoa.² Medium tersebut merupakan medium yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post thawing* relatif tinggi,⁵ oleh karena itu medium tersebut direkomendasikan sebagai *cryoprotective medium* untuk simpan beku spermatozoa manusia.^{4,6} Medium TESTYC mengandung TES-Tris dan Na-sitrat sebagai buffer, gliserol sebagai *cryoprotectant*, kuning telur, dan fruktosa sebagai sumber energi.^{2, 4, 9} TES-Tris merupakan buffer yang berfungsi baik pada *pre-freeze* maupun *post-thawing*.⁵ TES-Tris buffer dapat mengikat ion hidrogen pada medium sehingga mempercepat proses dehidrasi.⁵

Gliserol dalam medium merupakan *cryoprotectant* yang dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan berlangsung.¹ Gliserol merupakan *cryoprotectant* yang paling umum digunakan dalam simpan beku spermatozoa manusia.² Pada medium simpan beku tanpa gliserol, hasil *thawing* yang didapat menunjukkan *survival* spermatozoa yang lebih rendah dibanding medium yang mengandung gliserol. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa gliserol dalam medium simpan beku dapat berfungsi sebagai *cryoprotectant* dan sangat penting untuk mempertahankan *survival* spermatozoa. Pada proses *thawing*, simpan beku dalam medium tanpa gliserol menyebabkan terjadinya penurunan *recovery of motile* spermatozoa oleh karena terjadi penurunan *survival* spermatozoa. Dengan adanya gliserol sebagai *cryoprotectant* dalam medium, motilitas *post thawing* akan lebih terjaga.⁵

Medium TESTYC memiliki tekanan osmotik 325 mOsm sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan tekanan osmotik cairan intra sel, (tekanan osmotik sel

berkisar 290 mOsm).^{4,21} Pada medium dengan osmolaritas melebihi 2000 mOsm, membran sel akan kehilangan integritasnya.²²

Kuning telur dalam medium TESTYC bukan merupakan *cryoprotectant* tetapi berfungsi mempertahankan fluiditas membran sel.² Pada kuning telur terdapat lemak yang antara lain tersusun atas gliserol dan kolesterol. Komponen tersebut diketahui dapat mempertahankan integritas sel pada saat terjadi penurunan suhu.^{2,8,9}

Fruktosa dengan konsentrasi 2 % dalam medium TESTYC merupakan penyimpan sumber energi bagi spermatozoa pada kondisi *in vitro*,^{5, 9} sedangkan keberadaan sitrat pada medium berfungsi sebagai buffer dan tersusun dalam bentuk Na-sitrat.^{2,4,5} Untuk mereduksi keasaman dilakukan dengan cara mengeluarkan ion H^+ dari dalam sel. Satu ion H^+ akan dipompa keluar dari sel untuk tiap Na^+ yang masuk ke dalam sel. Dengan demikian pH intrasellular akan terjaga sekitar 7,2.⁸

Hal lain yang juga perlu dipertimbangkan dalam penggunaan medium ini adalah perbandingan jumlah semen dan medium. Perbandingan yang umum digunakan adalah 1 : 1, dengan medium yang mengandung baik buffer, *cryoprotectant* maupun substansi proteksi yang lain^{2, 4}. Perbandingan jumlah semen dan medium yang ditambahkan 1:1 ; 1:2 ; 1:3 ; 1:4, tidak mempengaruhi *survival* spermatozoa.²³

2.2. Tinjauan umum morfologi, motilitas dan vitalitas spermatozoa manusia

Spermatozoa manusia, melalui proses spermatogenesis, mengalami perubahan dari spermatogonium sampai akhirnya menjadi spermatozoon. Keseluruhan proses terjadi di dalam tubulus semeniferus testis.^{2, 24} Maturasi spermatozoa *post testicular* meliputi kombinasi perubahan morfologi, biokimia, biofisik dan metabolik. Secara fisiologis spermatozoa mengalami perkembangan dan akan memiliki kemampuan untuk memfertilisasi sel telur. Perubahan morfologi yang menonjol antara lain adalah hilangnya droplet sitoplasma.² Struktur spermatozoa *mature*, terdiri dari kepala dengan akrosom dan nukleus. Bagian tengah (*midpiece*) terdapat mitokondria, sitoplasma, aksonema, dan serabut padat luar. Bagian ekor terdapat aksonema dan selubung fibrosa. Aksonema merupakan struktur kompleks yang terdiri dari 9 pasang mikrotubulus yang saling berhubungan melalui nexin dan berhubungan dengan selubung sentral dari sepasang mikrotubulus sentral melalui jari-jari radial.^{15, 24}

Dasar struktural gerakan spermatozoa adalah ekor spermatozoa dengan aksonema sentral dan serabut padat luar. Bagian *proksimal* yang dikenal sebagai bagian tengah (*midpiece*) dikelilingi oleh mitokondria yang menyediakan energi untuk pergerakan spermatozoa. Sembilan serabut mikrotubulus di bagian luar merupakan unit kontraktile utama sedangkan mikrotubulus di bagian tengah berfungsi sebagai konduktor impuls yang cepat dan menghasilkan gerakan ritmik.⁹

Motor pergerakan spermatozoa adalah bagian luar dan dalam dari lengan *dynein* yang menonjol keluar pada setiap pasang mikrotubulus. Saat ATP-ase

dynein diaktifkan pada setengah bagian aksonema longitudinal, lengan *dynein* mendorong jembatan pasangan mikrotubulus. Dengan pembentukan dan pemutusan yang berulang dari jembatan *dynein*, maka terjadilah gerakan menggeser dari pasangan mikrotubulus yang diartikan sebagai gerakan melekuk flagella. Saat gerakan menggeser berpindah pada setengah bagian mikrotubulus yang lain, maka akan terjadi gerakan melekuk yang berlawanan arah. Lengan dalam *dynein* berfungsi sebagai inisiasi gerakan melekuk dan menjaga sudut yang memperbanyak gerakan melekuk. Lengan luar *dynein* tidak esensial untuk gerakan flagella, tetapi berfungsi untuk membangkitkan tenaga untuk mengatasi resistensi gerakan melekuk yang kaku dan mengatur kontinuitas gerakan melekuk serta frekuensi irama gerakan.¹⁵

Mitokondria pada spermatozoa berada pada bagian tengah (*midpiece*).¹⁵ Fungsi utama mitokondria adalah memproduksi energi tinggi (ATP) melalui fosforilasi oksidatif dan memberikan energi ke seluruh bagian sel. Fosforilasi oksidatif mempunyai dua tahapan, pertama oksidasi untuk melepas energi dari senyawa organik, dan tahapan ke dua adalah fosforilasi. Hasilnya energi yang dilepas akan berikatan dengan ADP dan menjadi ATP.²⁵

Adenosin Triphosphat (ATP) merupakan sumber energi untuk motilitas spermatozoa.^{9, 25} Paling sedikit ada empat substansi pada semen yang dapat digunakan secara langsung atau tidak langsung sebagai energi untuk menjaga motilitas spermatozoa. Keempat substansi tersebut adalah fruktosa, sorbitol, *Glycerol Phosphoryl Choline (GPC)*, dan plasmalogen. Ketiga substansi pertama terdapat pada seminal plasma, sedang plasmalogen terdapat pada spermatozoa

sendiri. Keempat substansi tersebut dapat dipergunakan sebagai energi oleh spermatozoa apabila tersedia oksigen.⁹

Istilah vitalitas spermatozoa mengacu pada istilah viabilitas spermatozoa, walaupun vitalitas spermatozoa bukan merupakan hal yang rutin untuk diperiksa, tetapi pada keadaan tertentu diperlukan untuk mengetahui akurasi motilitas spermatozoa.² Pengujian vitalitas dilakukan bila prosentase spermatozoa *immotile* melebihi 50 %.²⁶ Prinsip pengujian vitalitas spermatozoa adalah spermatozoa yang hidup akan mengeluarkan zat warna eosin sehingga spermatozoa tidak berwarna sebaliknya spermatozoa yang mati dengan membran yang rusak ataupun intak tidak mampu mengeluarkan dan menahan zat warna sehingga akan masuk ke dalam dan spermatozoa akan berwarna merah.² Dengan berkembangnya *Inter Cytoplasmic Sperm Injection* (ICSI) maka uji vitalitas dengan eosin ini menjadi sangat penting, karena dapat membedakan sel mati dari sel yang hidup yang dapat digunakkan untuk ICSI.^{17,27}

2.3. Parameter semen yang umum diamati sebelum dan sesudah simpan beku semen (*semen cryopreservation*)

Parameter semen yang umum diamati sebelum simpan beku spermatozoa meliputi : volume ejakulat (mL), konsentrasi spermatozoa ($n \times 10^6 / mL$), motilitas (%) dan morfologi spermatozoa.²⁸ Vitalitas spermatozoa merupakan parameter yang diamati untuk menguji ketepatan evaluasi motilitas spermatozoa.²⁶ Setelah simpan beku, disamping motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa perlu juga diamati *cryosurvival factor* (CSF) untuk mengetahui keberhasilan penyimpanan.²

2.3.1. Pengukuran volume ejakulat

Volume normal ejakulat adalah 2 – 6 mL. Volume ejakulat yang sedikit, umumnya disebabkan oleh adanya *obstruksi* akibat adanya infeksi pada *tractus genitalis*. Sedikitnya volume ejakulat juga dapat disebabkan karena adanya ejakulasi *retrograde*. Hal tersebut sering terjadi pada orang yang pernah mengalami pembedahan prostat. Ejakulasi *retrograde* dapat didiagnosis dengan pemeriksaan sampel urine setelah ejakulasi.²⁹ Volume ejakulat dapat diukur dengan menggunakan tabung berskala pada saat koleksi. Penggunaan *syringe* plastik berpelumas dapat merusak motilitas spermatozoa, sehingga tidak dapat digunakan.²⁶

2.3.2. Penghitungan jumlah spermatozoa

Penghitungan secara akurat konsentrasi spermatozoa (juta spermatozoa tiap mL semen) merupakan parameter penting untuk mengevaluasi aspek kuantitatif spermatogenesis. Metoda paling akurat untuk pengamatan konsentrasi spermatozoa yang rutin dilakukan di laboratorium adalah penghitungan dengan hemositometer.²⁸ Pengenceran untuk penghitungan konsentrasi spermatozoa menggunakan hemositometer digunakan bahan pengencer 5% NaHCO₃ dan ditambahkan 40% formaldehide.^{2, 28, 29} Konsentrasi spermatozoa normal adalah $\geq 20 \times 10^6$ per mililiter semen.²

2.3.3. Pengamatan motilitas, morfologi dan vitalitas spermatozoa

Dewasa ini motilitas dapat diamati dengan dua metode. Pertama dengan observasi manual, menggunakan mikroskop cahaya. Kedua, dengan cara yang lebih maju yaitu analisis semen secara otomatis dengan menggunakan teknik CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*). Penggunaan CASA telah dikembangkan beberapa tahun namun belum digunakan sebagai analisa rutin karena secara komersial, baik dari segi harga maupun akurasi, alat ini lebih mahal dan tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan pengukuran manual oleh teknisi yang telah terlatih.³⁰

Pengamatan dengan metoda manual, dilakukan setelah semen ditetaskan pada gelas objek mikroskop yang bersih dan ditutup dengan gelas penutup. Tetesan harus mengisi penuh area di bawah gelas penutup, dengan tanpa ruang kosong atau tanpa kelebihan spesimen. Pemeriksaan dilakukan dengan memeriksa 10 bidang pandang dengan perbesaran lensa 400 kali dan dihitung jumlah spermatozoa yang motil, kemudian dihitung prosentasenya. Tingkatan tipe gerakan atau keagresifan, atau kecepatan gerakan ke depan (progresif) biasanya dilakukan sesuai system tingkatan dengan skala 0 – 4, 1 – 5, atau 1 – 10.²⁹ Stratifikasi gerakan ke depan menurut standar WHO²⁶ yang umum digunakan adalah sebagai berikut :

- a. Spermatozoa bergerak cepat ke depan.
- b. Spermatozoa bergerak lambat atau sulit bergerak maju
- c. Spermatozoa tidak bergerak maju, atau bergerak ditempat
- d. Spermatozoa tidak bergerak.

Prosentase motilitas spermatozoa yang memenuhi kriteria adalah $a + b \geq 50 \%$.^{2, 26}

Spermatozoa disebut normal jika semua bagian spermatozoa yang meliputi kepala, bagian tengah dan ekor berbentuk normal. Kepala yang normal berbentuk oval, panjang 4 – 5 μm , lebar 2,5 – 3,5 μm , dan rasio panjang : lebar berkisar antara 1,5 – 1,75. Akrosom yang berada diujung kepala besarnya sekitar 40 – 70 % dari area kepala. Bagian tengah berbentuk ramping dengan ukuran kurang dari 1 μm , panjang bagian tengah 1,5 kali panjang kepala dan melekat pada kepala. *Droplets* sitoplasma biasanya kurang dari $\frac{1}{2}$ ukuran kepala normal. Ekor spermatozoa berbentuk lurus dan lebih tipis dari bagian tengah, dengan panjang sekitar 4,5 μm . Kategori spermatozoa cacat adalah apabila : kepala besar, kecil, *tapering*, *amorf* (tidak berbentuk), bervakuola > 20 %, area akrosom < 40%, kepala kembar, insersi bagian tengah asimetri, tebal bagian tengah tidak rata, ekor pendek, lebih dari satu, terputus, melengkung > 90 %, tebal tidak rata, berbentuk *coiled*. Batas morfologi spermatozoa normal yaitu $\geq 30\%$.²

Vitalitas spermatozoa ditunjukkan dengan perbandingan antara spermatozoa yang hidup dengan spermatozoa yang mati yang ditentukan melalui eksklusi pewarnaan, berdasarkan prinsip bahwa sel yang mati dengan atau tanpa kerusakan membran sel, sel tersebut akan terwarnai oleh zat pewarna. Vitalitas spermatozoa digunakan untuk menguji akurasi evaluasi motilitas. Perbedaan sel hidup dan sel mati adalah sel hidup tidak terwarnai dan sel mati terwarnai oleh zat pewarna. Prosentase vitalitas spermatozoa ditentukan dengan penghitungan 200 spermatozoa dengan mikroskop cahaya.²⁶

2.3.4. *Cryosurvival factor*

Keberhasilan penyimpanan semen beku dapat diperkirakan dengan persentase kembalinya motilitas, atau *cryosurvival factor* (CSF) yang dihitung dengan rumus :

$$\text{CSF} = \frac{\% \text{ motilitas spermatozoa setelah penuaian}}{\% \text{ motilitas spermatozoa sebelum pembekuan}} \times 100$$

Penyimpanan semen beku dapat dikatakan berhasil bila *cryosurvival factor* $\geq 50\%$ ².

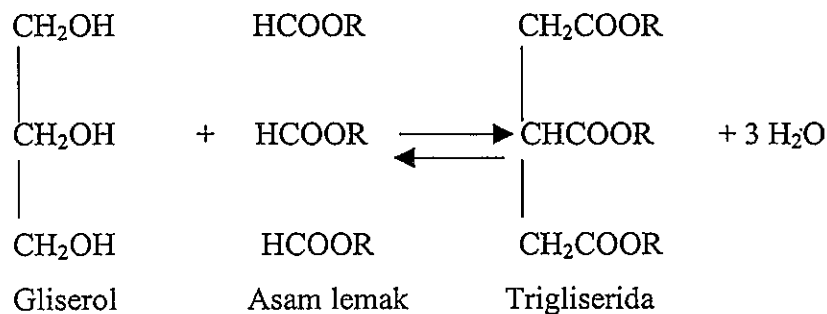
2.4. Komposisi kimia telur

Telur burung mempunyai komposisi substansi dasar penyusun kehidupan hewan. Fungsi telur adalah untuk memproduksi organisme baru. Materi dasar untuk organisme baru tersebut disuplai oleh telur itu sendiri. Dengan demikian telur berisi materi yang mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio.⁷

Seperti jaringan hewan lainnya, telur terdiri dari air (bagian terbesar), protein, lemak, karbohidrat, dan sebagian senyawa anorganik atau mineral yang prosentase komposisi kandungannya bervariasi antar spesies burung. Telur burung air (bebek dan angsa) mengandung sedikit air dan lebih banyak lemak dibandingkan dengan burung darat (ayam). Hal ini merupakan kepentingan biologis, mungkin disebabkan karena perkembangan embrio membutuhkan suhu yang lebih panas, dan sarang burung air secara alami berada dekat perairan sehingga suhunya rendah. Komposisi kuning telur lebih kompleks dibandingkan

putih telur. Protein kuning telur adalah ovovitelin dan ovolivetin dengan perbandingan 4 : 1. Ovovitelin merupakan phosphoprotein sedang ovolivetin merupakan protein yang mengandung unsur sulfur. Pada telur, lipid berada dalam bentuk lemak murni dan lemak campuran (sebagai campuran adalah phosphor, nitrogen, dan gula). Lemak pada telur 99 % terdapat pada kuning telur. Lemak merupakan bagian terbesar dari penyusun kimia kuning telur setelah air. Komposisi lemak kuning telur kemungkinan merupakan faktor yang mempengaruhi pengeraman telur. Lemak yang terdapat pada kuning telur terdiri dari gliserida, phospholipida, dan sterol masing-masing dengan prosentase sebesar 62,3%, 32,8%, dan 4,9%. Gliserida pada kuning telur terdiri dari gliserol dan asam lemak, dimana satu molekul gliserol dikombinasi dengan tiga asam lemak.⁷

Rumus bangun gliserida adalah sebagai berikut :



Asam lemak yang berikatan dengan gliserol pada gliserida berbeda sesuai dengan jenis unggas.³¹ Perbandingan komposisi kimia kuning telur pada ayam, bebek, dan angsa menurut Romanoff & Romanoff tahun 1963 adalah sebagai berikut :

Jenis Hewan / Kandungan Kimia	Ayam	Bebek	Angsa
Air	48,7 %	44,8 %	43,3 %
Protein	16,6 %	17,7 %	18,0 %
Lemak	32,6 %	35,2 %	36,0 %
Karbohidrat	1,0 %	1,1 %	1,1 %
Senyawa anorganik	1,1 %	1,2 %	1,6 %

Karbohidrat yang terdapat pada telur, terutama berbentuk glukosa yang berada baik pada putih telur maupun kuning telur. Kuning telur mempunyai 1,1 % mineral, antara lain Na, K, P, Ca, Mg, S, Fe yang digunakan pada proses pembentukan embrio. Kuning telur merupakan emulsi suatu sistem droplet minyak yang berada pada medium cair. Sebagai tambahan emulsi ini berisi protein yang berupa *lyophilic colloid* yang berefek stabilisasi sehingga kuning telur tidak hanya berfungsi sebagai pengemulsi tetapi juga merupakan stabiliser yang baik.⁷

Kuning telur juga mengandung hormon dan enzim tertentu. Hormon yang terkandung dalam kuning telur adalah estrogen. Disamping hormon tersebut, terdapat pula substansi yang menstimulasi hormon tiroid. Enzim pada kuning telur antara lain lipase, phosphatase, polipeptidase, juga katalase.⁷ Keberadaan enzim berfungsi mengkatalisis semua proses biokimiawi, misalnya enzim lipase akan mengkatalisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol.³²

2.5. Kerangka teori

Berdasarkan teori yang sudah dijelaskan terdahulu, maka dapat disusun kerangka teori sebagai berikut :

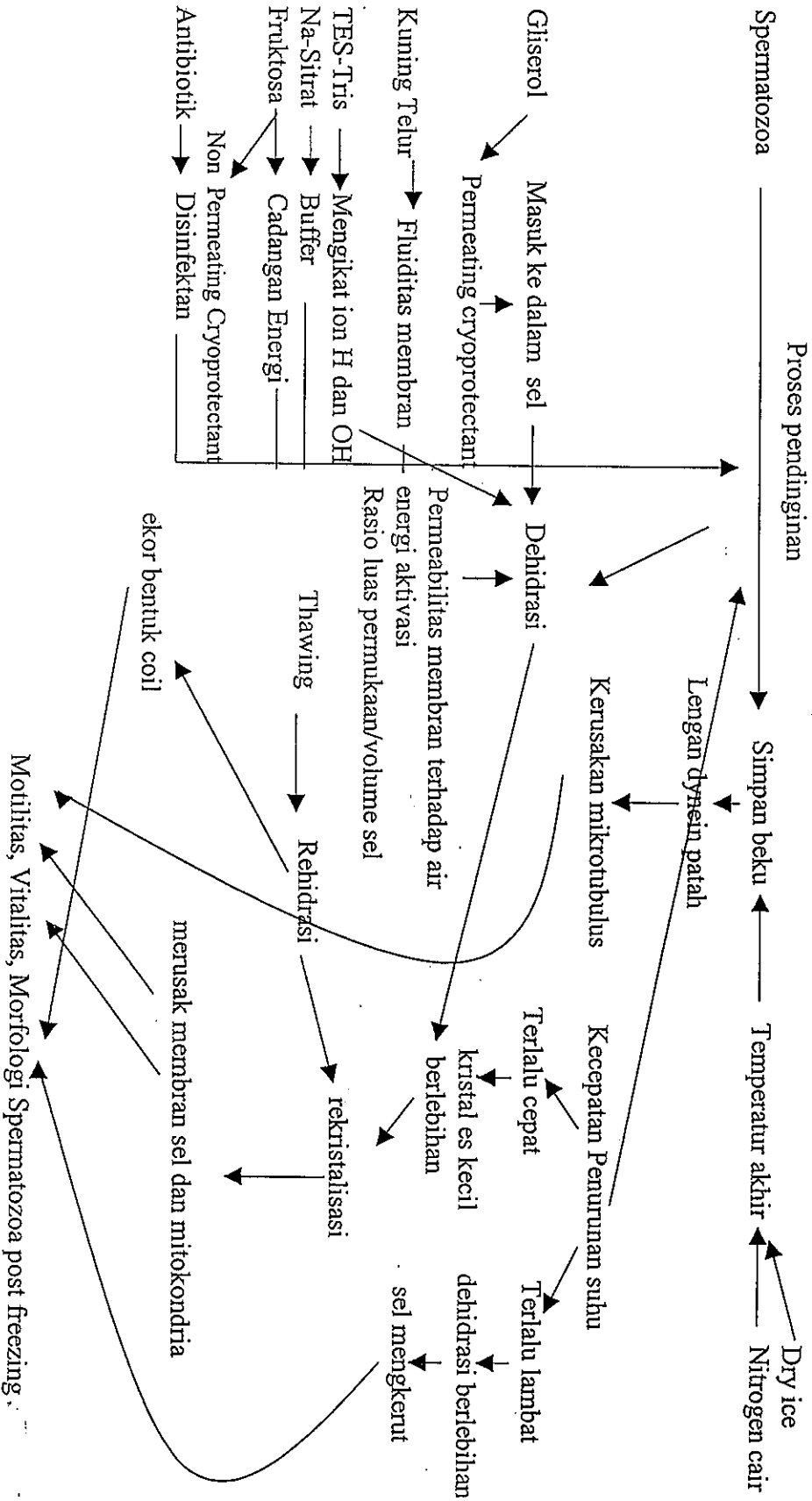
Selama proses simpan beku, mula-mula akan terjadi pembekuan pada bagian luar sel. Membran sel memblokir berkembangnya pembentukan kristal es ekstraselular ke arah intraselular, akibatnya cairan intraselular mengalami *supercooled*. Agar tekanan osmotik intraselular dan ekstraselular seimbang, air keluar dari sel (dehidrasi). Kecepatan dehidrasi dipengaruhi tiga hal yaitu : permeabilitas membran terhadap air, energi aktivasi permeabilitas membran, dan rasio luas permukaan membran /volume sel.

Proses pendinginan dapat menyebabkan patahnya lengan *dynein* pada mikrotubulus yang berakibat turunnya motilitas spermatozoa. Disamping hal tersebut, kecepatan penurunan suhu yang terlalu cepat menyebabkan air intraselular tidak sempat keluar sel dan membeku membentuk kristal es kecil di dalam sel. Saat *thawing* kristal es kecil mengalami agregasi menjadi kristal es besar, proses ini disebut rekristalisasi. Proses tersebut menyebabkan kerusakan membran sel dan organella terutama mitokondria yang berakibat kematian sel. Kecepatan penurunan suhu yang terlalu lambat menyebabkan dehidrasi berlangsung lama sehingga sel mengalami pengkerutan. Suhu akhir pada simpan beku spermatozoa dalam nitrogen cair adalah -196° C. Pada suhu tersebut semua proses biologis sel tidak berlangsung atau terhenti.

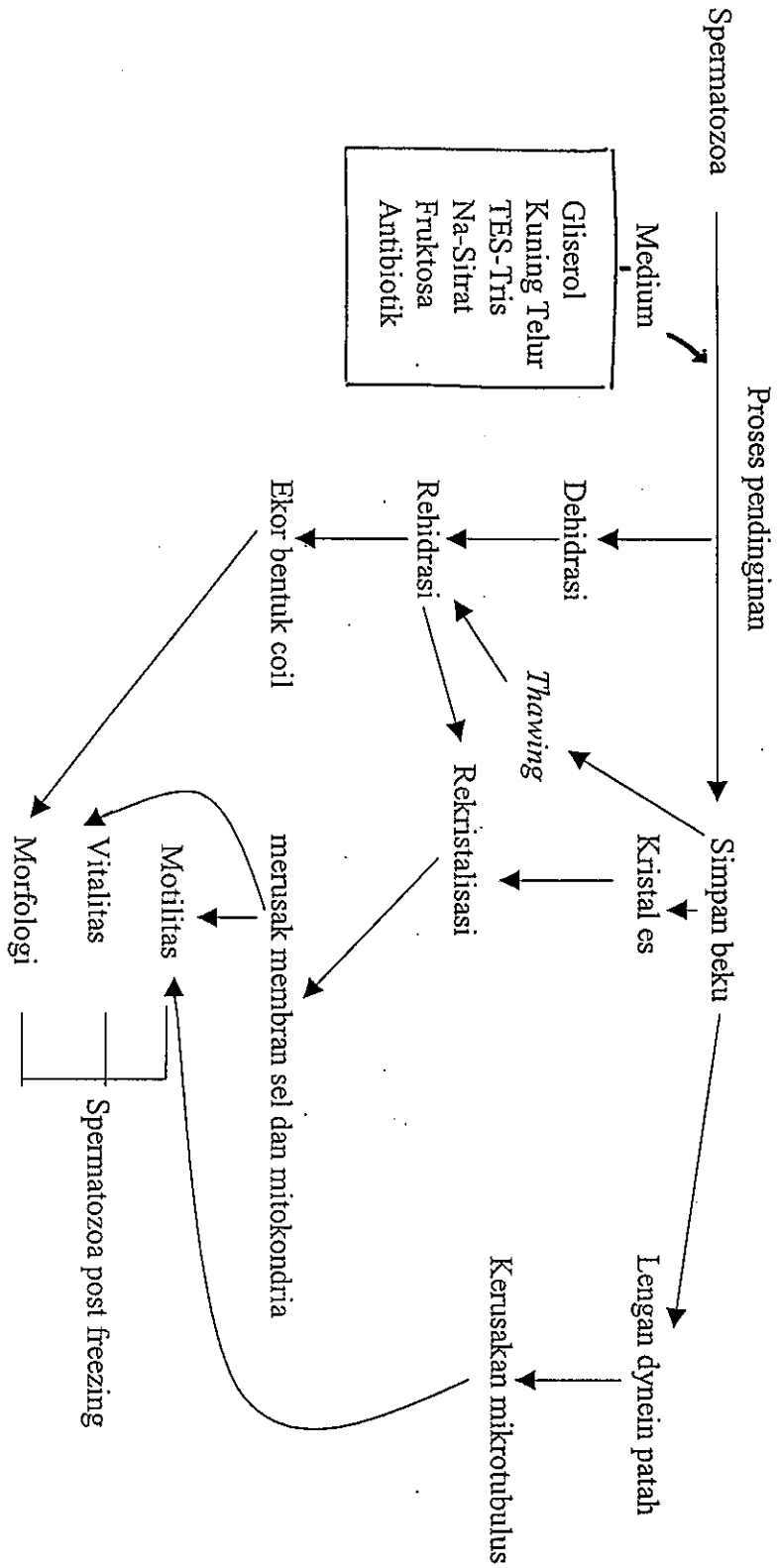
Sebelum dilakukan simpan beku, semen ditambah dengan medium dengan perbandingan semen : medium sama dengan 1 : 1. Medium simpan beku

spermatozoa yang digunakan tersusun atas : gliserol, kuning telur, TES Tris buffer, Na-sitrat, fruktosa dan antibiotik. Gliserol berfungsi sebagai *cryoprotectant*. Kuning telur disamping mengandung gliserol juga mengandung kolesterol yang berfungsi mempertahankan *fluiditas* membran sel pada suhu rendah. TES-Tris buffer dan Na-sitrat berfungsi sebagai buffer. Disamping itu TES-Tris buffer juga dapat berfungsi membantu proses dehidrasi. Fruktosa dalam medium berfungsi sebagai sumber energi. Antibiotik berfungsi sebagai *desinfectant* terhadap bakteri yang merupakan faktor eksternal.

2.5. Kerangka Teori



2.6. Kerangka Konsep



III. HIPOTESIS PENELITIAN

Berdasarkan uraian tersebut di atas, pada penelitian ini dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :

Dibandingkan dengan medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek, medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam dan medium m-TESTYC tanpa kuning telur, maka medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa dapat mempertahankan :

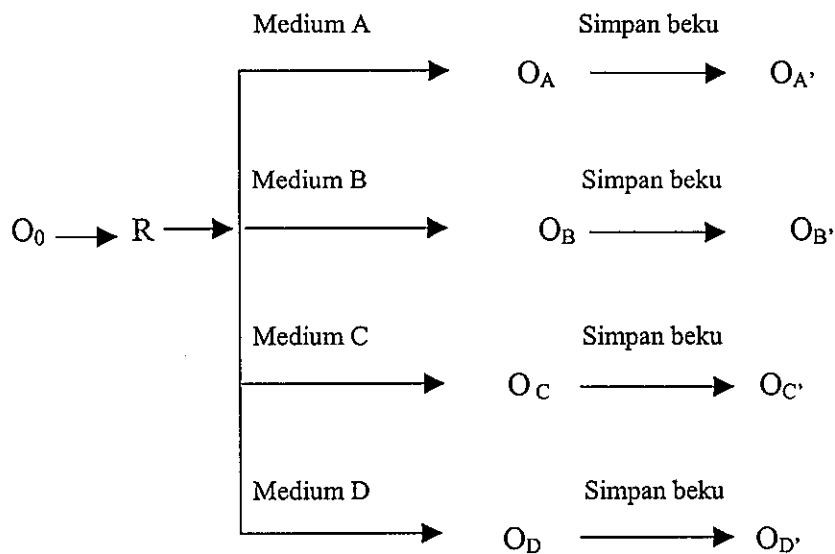
1. Motilitas spermatozoa *post freezing* tertinggi
2. Vitalitas spermatozoa *post freezing* tertinggi
3. Morfologi spermatozoa *post freezing* tertinggi

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan *Randomized Pre test and Post test Control Group Design* dengan *Blinding Experimental*.³³

4.2. Kerangka Penelitian



Keterangan :

R = Randomisasi

O_0 = Pengamatan awal

O_A = Pengamatan setelah penambahan medium A

O_B = Pengamatan setelah penambahan medium B

O_C = Pengamatan setelah penambahan medium C

O_D = Pengamatan setelah penambahan medium D

- O_A = Pengamatan setelah simpan beku dengan medium A
 O_B = Pengamatan setelah simpan beku dengan medium B
 O_C = Pengamatan setelah simpan beku dengan medium C
 O_D = Pengamatan setelah simpan beku dengan medium D

4.3. Sampel penelitian

Penetapan jumlah sampel menggunakan rumus sebagai berikut :

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15, \text{ dimana } t = \text{jumlah perlakuan}$$

$$n = \text{jumlah ulangan}$$

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan sehingga besarnya ulangan adalah $n \geq 6$, sehingga pada penelitian ini jumlah sampel minimal 24.³⁴

Sampel dalam penelitian ini adalah semen yang berasal dari pria dewasa, yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Pada penelitian ini ulangan perlakuan dilakukan sebanyak 30 kali, dengan demikian dibutuhkan 30 pria dewasa sebagai donor semen. Kriteria inklusi yang diterapkan pada penelitian ini adalah : jumlah spermatozoa > 15 juta/mL, volume semen ≥ 2 mL dan motilitas $a + b \geq 50$ %, leukosit $< 1 \times 10^6$ /mL, pH $7 \leq x \leq 8$, viscositas: panjang benang lebih kurang = 2 cm, morfologi ≥ 15 %.

4.4. Parameter yang diamati

Pada penelitian ini parameter yang diamati adalah^{2, 28} :

- motilitas spermatozoa (dalam %)
- morfologi spermatozoa (dalam %)

- vitalitas spermatozoa (dalam %)
- *Cryosurvival factor* (dalam %)

Parameter tersebut diamati sebelum diberi *cryoprotectant*, setelah diberi *cryoprotectant* sebelum dibekukan dan setelah dibekukan.

4.5. Variabel penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas adalah jenis kuning telur
2. Variabel tergantung adalah motilitas spermatozoa, morfologi spermatozoa, vitalitas spermatozoa setelah penuaian

4.5.1. Definisi variabel

1. Jenis kuning telur yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kuning telur angsa, kuning telur bebek, dan kuning telur ayam
2. Motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa dihitung berdasarkan standard WHO. Prosentase motilitas dihitung dengan tingkat kecepatan gerak ke depan a dan b. Prosentase stratifikasi kecepatan gerak ke depan $a + b \geq 50 \%$. Prosentase vitalitas dihitung dari jumlah spermatozoa yang tidak berwarna. Prosentase vitalitas spermatozoa minimal $\geq 75 \%$. Prosentase morfologi dihitung dari jumlah morfologi normal. Prosentase morfologi normal $\geq 15 \%$

4.6. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Andrologi RS Telogorejo Semarang mulai tanggal 15 Agustus 2000 sampai dengan 15 Desember 2000.

4.7. Bahan penelitian

1. Semen yang didapat dari 30 orang pria dengan cara masturbasi dengan *abstinensi* selama 3 – 5 hari.
2. Sebagai pendingin digunakan nitrogen cair yang dibeli dari distributor Aneka Gas Semarang
3. Medium terdiri dari :
 - a. Medium *modified TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) tanpa kuning telur, dengan komposisi TES (hidroksimetil metil-2-amino ethana asam sulfonat)–Tris (hidroksimetil amino methana), Sodium sitrat, fruktosa, penicilin-G, streptomisin sulfat, gliserol,^{1,2} sebagai kelompok kontrol (kelompok perlakuan A)
 - b. Medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam, sebagai kelompok perlakuan B
 - c. Medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek, sebagai kelompok perlakuan C
 - d. Medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa, sebagai kelompok perlakuan D
4. Na_2HCO_3 dan 40% formaldehyde, sebagai pengencer semen dalam penghitungan jumlah spermatozoa

5. Bahan untuk analisis morfologi spermatozoa, terdiri dari :

- Safranin
- Kristal violet
- Asam asetat
- Alkohol absolut
- PBS (*Phosphat Buffer Saline*)

6. Bahan untuk uji vitalitas spermatozoa terdiri dari : Eosin Y, larutan NaCl

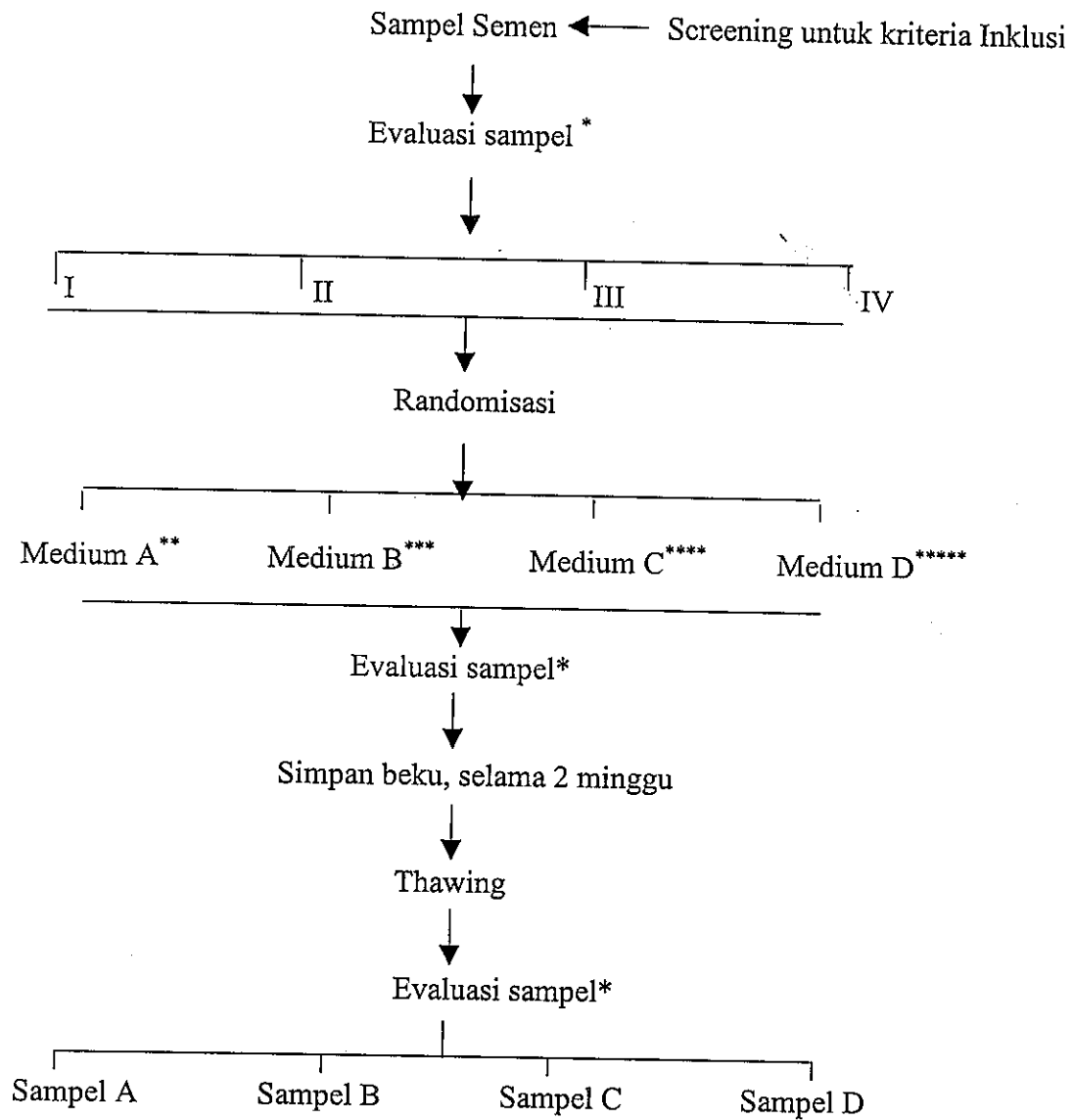
4.8. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

1. Tempat penampungan sperma, tabung kaca dan telah disterilkan
2. Alat untuk penyimpanan beku semen yang terdiri atas :
 - a. Kontainer
 - b. Goblet
 - c. *Canister*
 - d. *Straw*
3. Tempat untuk penuaian (*thawing*), bahan dari kaca yang telah disterilkan
4. Seperangkat alat untuk pengukuran volume semen serta pemeriksaan motilitas, morfologi, vitalitas, pH, viscositas, leukosit, dan jumlah spermatozoa, terdiri atas :
 - a. Mikroskop
 - b. Pipet
 - c. Gelas benda

- d. Gelas penutup
 - e. Batang pengaduk
 - f. Tabung berskala untuk pengukuran volume ejakulat
 - g. Hemositometer untuk penghitungan jumlah spermatozoa
 - h. *Staining jar* untuk pewarnaan spermatozoa
 - i. Counter
5. Timbangan untuk menimbang bahan kimia medium
 6. Gelas ukur untuk mengukur bahan kimia medium dan volume semen
 7. Osmometer untuk mengukur tekanan osmotik medium
 8. Kertas pH
 9. Mikropipet untuk mengambil medium dengan jumlah tertentu

4.9. Alur Kerja Penelitian



Keterangan :

- * motilitas, vitalitas dan morfologi
- ** m-TESTYC tanpa kuning telur
- *** m-TESTYC dengan kuning telur ayam
- **** m-TESTYC dengan kuning telur itik
- ***** m-TESTYC dengan kuning telur angsa

4.10. Cara Penelitian

Cara penelitian ini meliputi :

4.10.1 Cara pembuatan medium TEST-Tris yolk citrat yang dimodifikasi (m-TESTYC)

TES (hidroksimetil metil-2-amino ethana asam sulfonat) – Tris (hidroksimetil amino methana) disiapkan dengan cara mentitrasi 325 mOsm TES dengan 325 mOsm TRIS. Selanjutnya 48% (v/v) TES-Tris, 30 % Na-sitrat, 20% kuning telur yang telah di-inaktivasi pada suhu 56 °C selama 60 menit, 2 % fruktosa dicampurkan kemudian disentrifug selama 10 menit dengan 10.000 g. Supernatan disaring dengan kertas Whatman I kemudian ditambahkan gliserol sehingga konsentrasi gliserol mencapai 6 % dari keseluruhan volume larutan. Langkah terakhir adalah menambahkan penicillin G (1000 IU/mL) dan streptomycin (1 mg/mL) ke dalam campuran medium.^{1,2,5}

4.10.2. Cara pengukuran volume ejakulat

Semen didapat dengan cara masturbasi setelah *abstinensi* 3 – 5 hari. Semen ditampung dengan tabung kaca berskala. Dengan membaca skala yang ditunjuk oleh semen yang tertampung dapat diketahui volume semen. Volume semen normal berkisar 2 – 6 mL.²⁶ Pada penelitian ini seluruh ejakulat digunakan sebagai sampel.

4.10.3. Cara penghitungan jumlah spermatozoa

Semen yang telah diukur volumenya, diambil secukupnya kemudian diencerkan dengan cara menambahkan pengencer dengan perbandingan

semen : pengencer = 1 : 10 (v/v) dan 1 : 20 (v/v) sesuai dengan jumlah spermatozoa perbidang pandang dengan perbesaran mikroskop 400 kali. Cara penghitungan konsentrasi spermatozoa dalam semen adalah sebagai berikut²⁶:

1. Hemositometer dengan gelas penutup di pasangkan pada mikroskop dengan perbesaran 40 X 10.
2. 10 μ L semen yang telah diencerkan diambil dengan pipet khusus pada hemositometer, digojok kemudian dituangkan pada hemositometer.
3. Dilakukan penghitungan jumlah spermatozoa pada Improved Neubauer Hemositometer yang berada pada 25 kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil
4. Faktor konversi yang digunakan adalah 4 untuk pengenceran 1 : 10 dengan 10 kotak pengamatan, dan faktor konversi 2 untuk pengenceran 1 : 20 dengan 10 kotak pengamatan.
5. Jumlah spermatozoa ditentukan sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlah spermatozoa terhitung}}{\text{Faktor konversi}} \times 10^6$$

4.10.4. Cara pemeriksaan motilitas spermatozoa

Semen ditetaskan pada gelas benda, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Tetesan harus mengisi penuh area di bawah gelas penutup tidak kurang dan tidak lebih. Untuk pemeriksaan motilitas diperiksa 10 bidang pandang dengan perbesaran 400 kali.²⁹ Setiap tetes semen yang berisi kurang lebih 10 μ L dihitung prosentase spermatozoa yang motil dari 200 spermatozoa. Untuk pemeriksaan gerakan progresif spermatozoa, digunakan kriteria stratifikasi gerakan progresif spermatozoa berdasarkan kriteria WHO²⁶ yaitu :

- a. Spermatozoa bergerak cepat ke depan
- b. Spermatozoa bergerak lambat, sulit bergerak maju.
- c. Spermatozoa tidak bergerak maju, bergerak ditempat
- d. Spermatozoa tidak bergerak

4.10.5. Cara penyediaan apusan untuk mengamati morfologi spermatozoa

Penyiapan apusan semen untuk pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan kristal violet dan safranin yang dimodifikasi oleh Wibowo dari metode Steeno & Bohlen Van Huele pada tahun 1989.³⁵ Untuk mendapatkan preparat yang lebih bersih, preparat difiksasi dengan fiksative Carnoy yang dimodifikasi oleh Wibowo (1984),³⁶ dengan cara sebagai berikut :

- Semen ditetaskan pada gelas benda yang bersih kemudian diratakan (*spread*) pada gelas benda tersebut
- Kemudian difiksasi selama 10 menit dengan asam asetat yang ditambah dengan alkohol absolut dengan perbandingan 1 : 1
- Sediaan dicelupkan ke dalam pewarna safranin 5 % yang dicampur dengan kristal violet 5% dalam PBS (*Phosphat Buffer Saline*) selama 10 menit
- Sediaan dibilas dengan air mengalir untuk menghilangkan kelebihan zat warna
- Sediaan ditutup dengan kaca penutup kemudian diamati pada perbesaran 400 kali
- Dihitung prosentase spermatozoa normal

4.10.6. Cara pengujian vitalitas spermatozoa.²⁶

1. Pembuatan larutan reagen eosin Y :

- 5 gram/L Eosin Y dilarutkan dalam larutan NaCl 9g/L

2. Cara pengujian :

- Setetes semen segar dicampur dengan setetes larutan Eosin pada kaca objek kemudian diaduk dan selanjutnya ditutup dengan gelas penutup dan dibiarkan selama 30 detik, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali
- Selanjutnya dilakukan penghitungan spermatozoa yang hidup (tidak terwarna/jernih) dan spermatozoa yang mati (terwarna merah), untuk menentukan prosentase spermatozoa yang hidup.

4.10.7. Cara pengukuran viscositas, pH dan jumlah leukosit semen.

4.10.7.1. Cara pengukuran Viscositas

- Setelah semen mengalami likuefaksi (*liquefaction*), batang pengaduk dicelupkan ke dalam cairan semen, kemudian batang pengaduk diangkat pelan- pelan, untuk mengukur panjang benang yang terbentuk oleh cairan semen yang terangkat.

4.10.7.2. Cara pengukuran pH.

- pH semen diukur dengan menggunakan kertas pH

4.10.7.3. Cara penghitungan jumlah leukosit.²⁶

1.Reagen pewarna peroxidase menggunakan ortho-toluidine

2.Prosedur :

- semen sebanyak 0,1ml dicampur dengan 0,9 ml larutan, kemudian dikocok selama 2 menit
- Campuran tersebut didiamkan selama 20-30 menit pada temperatur kamar, selanjutnya dikocok kembali
- Sel spermatozoa yang menunjukkan peroksidase positif terwarnai coklat, sedang yang menunjukkan peroxidase negatif tidak terwarnai.
- Diulakukan penghitungan dengan menggunakan bilik hitung improved Neubauer

4.10.8. Cara penyimpanan semen (*semen cryopreservation*).¹

1. Campuran semen dan medium yang digunakan untuk menyimpan ditempatkan pada cawan. *Straw* disiapkan sesuai jumlah volume campuran dan ukuran *straw*.
2. *Straw* diisi dengan campuran tersebut dengan cara menjepit *straw* kemudian diarahkan ke campuran semen dan medium dan pengisian *straw* dilakukan dengan cara menyedot
3. *Straw* diatur pada penjepit dan dibiarkan beberapa saat pada posisi datar untuk menghilangkan gelembung udara yang mungkin terbawa dalam pengisian di atas. Ujung *straw* yang telah terisi ditutup dengan wax

4. *Straw* yang telah ditutup ujungnya, diberi label yang menyatakan tanggal pengambilan sampel semen. Kemudian *straw* ditempatkan pada goblet dan disimpan pada nitrogen cair. Penyimpanan dilakukan dengan tahapan pendinginan sampel dimasukkan dalam almari es pada suhu 4 °C selama 15 menit kemudian dipindahkan ke dalam *freezer* dengan suhu - 20 °C selama 30 menit. Selanjutnya goblet ditempatkan pada *canister* dan diletakkan 10 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 10 menit pada suhu - 25 °C. Kemudian diturunkan hingga mencapai 5 cm di atas nitrogen cair selama 10 menit dengan suhu - 60 °C. Selanjutnya *canister* diturunkan hingga mencapai permukaan nitrogen cair selama 10 menit pada suhu - 100 °C. Akhirnya, *canister* dimasukkan ke dalam dasar tangki pada temperatur -196 °C, dicapainya temperatur tersebut ditandai dengan tidak terdapatnya gelembung udara yang keluar melalui mulut tangki penyimpan (*container*).

4.10.9. Cara penuaian (*thawing*).⁴

Setelah 2 minggu penyimpanan *straw* diambil dengan menggunakan *canister* dan dibiarkan pada suhu kamar sampai cair, setelah cair kemudian dilakukan penghitungan motilitas, vitalitas dan morfologi.

4.11. Cara Pengumpulan Data

Semen dari probandus ditampung dan kemudian diukur volumenya diambil sebagian secukupnya untuk dilakukan pengamatan yang meliputi screening untuk kriteria inklusi dan data awal. Selanjutnya semen yang tersisa

dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing untuk diberi medium yang berbeda dengan perbandingan 1 : 1. Penetapan jenis medium sebagai kelompok perlakuan penelitian dilakukan dengan *blinding* oleh pembantu peneliti, pemeriksa tidak diperkenankan mengetahui pengelompokan subyek sehingga tidak terjadi bias. Penentuan jenis perlakuan pada tiap kelompok dilakukan secara random dengan menggunakan tabel random. Kemudian diambil sebagian secukupnya untuk diamati sebagai data setelah penambahan medium dan sisanya ditempatkan dalam *straw* untuk disimpan dalam N₂ cair selama 2 minggu. Setelah 2 minggu, semen yang telah dibekukan diamati untuk pengumpulan data akhir.

4.11.1. Pengumpulan data awal

1. Pengumpulan data awal dilakukan sebelum dilakukan simpan beku semen. Semen dikumpulkan dengan cara masturbasi setelah 3 – 5 hari *abstinensi*. Ejakulat ditunggu sampai mengalami likuefaksi pada suhu kamar, selanjutnya pengamatan dilakukan tidak lebih dari 1 jam setelah ejakulasi
2. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya, meliputi²⁸:
 - Motilitas spermatozoa (dalam %)
 - Vitalitas spermatozoa (dalam %)
 - Morfologi spermatozoa (dalam %)

Pengamatan dilakukan pada semua sampel semen sebelum diberi *cryoprotectant* dan setelah diberi *cryoprotectant* sebelum dibekukan.

4.11.2. Pengumpulan data akhir

Pengumpulan data akhir dilakukan setelah penuaian (*thawing*).

Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya, meliputi²⁸:

- Motilitas spermatozoa (dalam %)
- Vitalitas spermatozoa (dalam %)
- Morfologi spermatozoa (dalam %)

Selanjutnya untuk mengetahui keberhasilan penyimpanan semen beku, dilakukan penghitungan CSF berdasarkan hasil penghitungan motilitas.²

4.12. Analisa Data

Data hasil penelitian ditabulasikan untuk dianalisa, selanjutnya untuk menentukan analisis parametrik atau non-parametrik, data yang diperoleh diuji normalitasnya dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dan dilanjutkan dengan uji homogenitas. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa tidak semua data terdistribusi normal. Dengan demikian untuk selanjutnya dilakukan analisis non parametrik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji lebih lanjut dengan menggunakan uji *Mann-Whitney U*.³⁷ Semua analisis dilakukan secara komputerisasi menggunakan program SPSS Versi 10.01.³⁸

V. HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel dan histogram. Adapun hasil selengkapnya adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil penghitungan rerata data screening kriteria inklusi yang diterapkan pada penelitian ini

Pengamatan	n	Rata-rata	Nilai minimum	Nilai maksimum
Volume (mL)	30	2,47	2,1	3,1
Jumlah (juta)	30	41,93	25	65
Viscositas (Cm)	30	2	2	2
pH	30	7,77	7,5	8,0
Leukosit	30	0,1183	0,0250	0,8750

Hasil penghitungan rerata data screening kriteria inklusi menunjukkan nilai minimum dan maksimum untuk semua data memenuhi kriteria inklusi yang diterapkan pada penelitian ini.

Tabel 2. Hasil penghitungan *cryosurvival factor* spermatozoa (dalam %) (Σ sampel = 120)

Motilitas Awal $X \pm SD$	Medium	Motilitas setelah simpan beku $X \pm SD$	CSF $X \pm SD$
59,00 \pm 5,59	A	17,90 \pm 2,52	31,41 \pm 3,96
	B	33,70 \pm 3,86	57,09 \pm 3,45
	C	30,47 \pm 2,93	51,69 \pm 2,46
	D	21,67 \pm 3,99	36,35 \pm 7,82

Keterangan : CSF = *Cryosurvival Factor*

Hasil analisis data motilitas sebelum dan sesudah simpan beku menunjukkan *cryosurvival factor* di atas 50% (untuk perlakuan B dan C). Dengan demikian dapat dikatakan prosedur simpan beku pada penelitian ini sudah benar.

Tabel 3. Hasil penghitungan rerata motilitas spermatozoa (dalam %) sebelum perlakuan, setelah penambahan medium simpan beku, dan setelah simpan beku (Σ sampel = 120)

	Motilitas Awal $\bar{X} \pm SD$	Medium	Motilitas setelah penambahan medium $\bar{X} \pm SD$	Motilitas setelah simpan beku $\bar{X} \pm SD$
	59,00 \pm 5,59	A	55,60 \pm 5,44 ^a	17,90 \pm 2,52 ^e
		B	55,87 \pm 5,71 ^a	33,70 \pm 3,86 ^b
		C	54,37 \pm 5,26 ^a	30,47 \pm 2,93 ^c
		D	54,73 \pm 5,85 ^a	21,67 \pm 3,99 ^d
KW			1,928	94,035
p			0,587	0,000

Keterangan : KW = Kruskal Walllis.

Hasil analisa dengan Mann Whitney U ditunjukkan dengan *superscript*. Angka yang diikuti dengan *superscript* yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$), sedang angka yang diikuti *superscript* berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Pada penelitian ini setelah penambahan medium motilitas spermatozoa antar kelompok perlakuan menunjukkan angka yang berbeda. Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ternyata perbedaan angka tersebut tidak signifikan ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa

penambahan medium yang berbeda tidak berpengaruh pada motilitas spermatozoa sebelum simpan beku.

Setelah dilakukan simpan beku motilitas spermatozoa antar kelompok perlakuan menunjukkan angka yang berbeda. Dari analisis statistik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ternyata perbedaan angka tersebut signifikan ($p < 0,05$). Perbedaan antar kelompok perlakuan lebih lanjut dianalisis dengan menggunakan uji *Mann Whitney U*, ternyata menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan adanya pengaruh dari medium m-TESTYC dengan komposisi yang berbeda pada motilitas spermatozoa selama simpan beku.

Tabel 4. Hasil penghitungan rerata vitalitas spermatozoa (dalam %) sebelum perlakuan, setelah penambahan medium simpan beku, dan setelah simpan beku (Σ sampel = 120)

	Vitalitas Awal $\bar{X} \pm SD$	Medium	Vitalitas setelah penambahan medium $\bar{X} \pm SD$	Vitalitas setelah simpan beku $\bar{X} \pm SD$
	78,70 \pm 3,22	A	75,70 \pm 3,96 ^t	37,43 \pm 2,93 ^j
		B	75,47 \pm 3,44 ^t	53,30 \pm 2,35 ^g
		C	73,93 \pm 3,32 ^t	50,00 \pm 1,78 ^h
		D	74,37 \pm 3,63 ^t	41,87 \pm 4,41 ⁱ
KW			5,864	97,351
p			0,118	0,000

Keterangan : KW = Kruskal Walllis.

Hasil analisa dengan Mann Whitney U ditunjukkan dengan *superscript*. Angka yang diikuti dengan *superscript* yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$), sedang angka yang diikuti *superscript* berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Pada penelitian ini setelah penambahan medium vitalitas spermatozoa antar kelompok perlakuan menunjukkan angka yang berbeda. Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ternyata perbedaan angka tersebut tidak signifikan ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan medium yang berbeda tidak berpengaruh pada vitalitas spermatozoa sebelum simpan beku.

Setelah dilakukan simpan beku motilitas spermatozoa antar kelompok perlakuan menunjukkan angka yang berbeda. Dari analisis statistik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ternyata perbedaan angka tersebut signifikan ($p < 0,05$). Perbedaan antar kelompok perlakuan lebih lanjut dianalisis dengan

menggunakan uji *Mann Whitney U*, ternyata menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan adanya pengaruh dari medium m-TESTYC dengan komposisi yang berbeda pada vitalitas spermatozoa selama simpan beku.

Tabel 5. Hasil penghitungan rerata morfologi spermatozoa (dalam %) sebelum perlakuan, setelah penambahan medium simpan beku, dan setelah simpan beku (Σ sampel = 120)

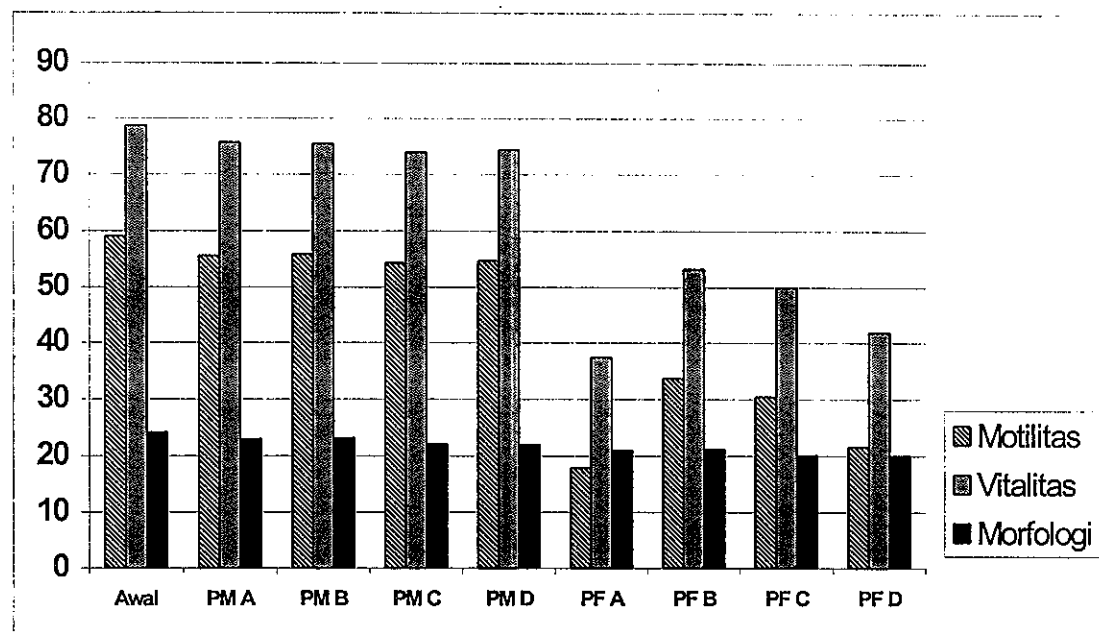
	Morfologi Awal $X \pm SD$	Medium	Morfologi setelah penambahan medium $X \pm SD$	Morfologi setelah simpan beku $X \pm SD$
	24,20 \pm 4,09	A	23,00 \pm 3,96 ^k	20,97 \pm 4,01 ^k
		B	23,20 \pm 4,09 ^k	21,20 \pm 4,09 ^k
		C	22,20 \pm 4,05 ^k	20,20 \pm 4,05 ^k
		D	22,03 \pm 4,05 ^k	20,06 \pm 4,01 ^k
KW			2,282	2,219
p			0,516	0,528

Keterangan : KW = Kruskal Wallis.

Hasil analisa dengan Mann Whitney U ditunjukkan dengan *superscript*. Angka yang diikuti dengan *superscript* yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$), sedang angka yang diikuti *superscript* berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Pada penelitian ini setelah penambahan medium morfologi spermatozoa antar kelompok perlakuan menunjukkan angka yang berbeda. Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ternyata perbedaan angka tersebut tidak signifikan ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan medium yang berbeda tidak berpengaruh pada morfologi spermatozoa sebelum simpan beku.

Setelah dilakukan simpan beku morfologi spermatozoa antar kelompok perlakuan menunjukkan angka yang berbeda. Dari analisis statistik dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* ternyata perbedaan angka tersebut tidak signifikan ($p > 0,05$). Perbedaan antar kelompok perlakuan lebih lanjut dianalisis dengan menggunakan uji *Mann Whitney U*, ternyata menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$) antar kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan adanya pengaruh dari medium m-TESTYC dengan komposisi yang berbeda pada morfologi spermatozoa selama simpan beku.



Gambar 1. Histogram rata-rata motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa sebelum penambahan medium, setelah penambahan medium dan setelah simpan beku

Keterangan
 Awal : Sebelum penambahan medium.
 PMA : Setelah penambahan medium A
 PMA : Setelah penambahan medium B
 PMA : Setelah penambahan medium C
 PMA : Setelah penambahan medium D
 PFA : Setelah simpan beku menggunakan medium A
 PFB : Setelah simpan beku menggunakan medium B
 PFC : Setelah simpan beku menggunakan medium C
 PFD : Setelah simpan beku menggunakan medium D

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka hipotesis yang menyatakan :

Dibandingkan dengan medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek, medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam dan medium m-TESTYC tanpa kuning telur, maka medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa dapat mempertahankan :

1. Motilitas spermatozoa *post freezing* tertinggi diterima
2. Vitalitas spermatozoa *post freezing* tertinggi diterima
3. Morfologi spermatozoa *post freezing* tertinggi ditolak

VI. PEMBAHASAN

6.1. Pengaruh penambahan medium *TES-Tris yolk citrat* terhadap motilitas spermatozoa *pre freezing* dan *post freezing*

Hasil pengamatan yang disajikan pada Tabel 1 menunjukkan nilai semua data *screening* kriteria inklusi memenuhi kriteria yang diterapkan pada penelitian sehingga dapat dikatakan data awal terkendali. Batas semua nilai kriteria yang disajikan pada Tabel 1 sesuai dengan batas normal kriteria yang ditetapkan oleh WHO tahun 1999. Hal tersebut menunjukkan sampel semen yang dipakai pada penelitian ini dalam kondisi normal. Bila pada data akhir pengamatan terdapat penurunan dari parameter yang diamati maka hal tersebut disebabkan oleh pengaruh penambahan medium atau pengaruh simpan beku, tetapi bukan disebabkan oleh faktor kondisi awal sampel.

Mengacu pada data *survival* spermatozoa pada Tabel 2 yang menunjukkan *survival* spermatozoa tertinggi $57,09 \pm 3,45$ % (pada kelompok perlakuan medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam). Menurut Mortimer tahun 1994,² akurasi prosedur simpan beku ditunjukkan oleh *survival* spermatozoa *post freezing* yang mencapai 50% atau lebih. Hal tersebut menunjukkan menurunnya motilitas spermatozoa diperkirakan akibat dari proses pembekuan atau mungkin disebabkan oleh penambahan medium sebelum pembekuan tetapi bukan akibat kesalahan prosedur simpan beku.

Masalah utama dari simpan beku untuk semua jenis sel adalah kematian sel yang diakibatkan oleh terbentuknya kristal es intrasellular.¹³ Pada saat

penghangatan kembali (*thawing*), kristal-kristal es tersebut akan bergabung membentuk kristal es yang lebih besar, proses ini disebut rekristalisasi. Kristal es besar hasil rekristalisasi ini merupakan faktor fisik yang menyebabkan kerusakan mitokondria yang menyebabkan motilitas spermatozoa *post freezing* mengalami penurunan.¹¹

Pemilihan *cryoprotective medium* untuk simpan beku spermatozoa didasarkan pada kemampuan medium tersebut menjaga integritas dan fungsi sel selama proses pembekuan dan *thawing*.⁴ Menurut penelitian Weidel & Prins pada tahun 1987,³ medium yang digunakan sebagai simpan beku spermatozoa adalah medium *TES-Tris yolk citrat* (TESTYC) mempunyai tekanan osmotik 325 mOsm yang menyebabkan medium tersebut sedikit hipertonis sehingga akan mempercepat proses dehidrasi.¹ TES-Tris buffer dalam medium berhubungan dengan kapasitas ion-ion dipolar untuk mengikat hidrogen bebas dan ion-ion hidroksil pada medium, dengan demikian mempercepat proses dehidrasi selama proses pembekuan berlangsung.⁴ Dehidrasi menyebabkan berkurangnya air intrasellular sehingga berakibat berkurangnya es intrasellular yang terbentuk.¹³

Medium m-TESTYC tersusun atas beberapa komponen, yaitu gliserol, TES-Tris dan Na-sitrat sebagai buffer, fruktosa dan kuning telur.² Medium untuk penyimpanan semen mengandung buffer dan gula dalam bentuk fruktosa, medium ini dapat menstimulasi aktivitas spermatozoa sehingga meningkatkan rentang hidupnya dan tidak merusak motilitas spermatozoa tersebut. Buffer yang umum digunakan pada medium penyimpanan antara lain sitrat, fosfat atau karbonat.

Pada umumnya spermatozoa sangat aktif dan dapat bertahan dalam waktu yang lebih lama pada pH berkisar 7.⁷

Keberadaan gliserol dalam medium merupakan *cryoprotectant* yang sangat penting untuk mempertahankan *survival* selama dan sesudah simpan beku.⁴ Sebagai *cryoprotectant* gliserol merupakan substansi *permeating*.³ Dengan demikian gliserol dapat memasuki sel. Pada saat medium ditambahkan akan terjadi reaksi osmotik, sel akan kehilangan air. Selanjutnya sel akan mengabsorpsi *cryoprotectant* sehingga volume sel pulih kembali. Masuknya *cryoprotectant* ke dalam sel mengakibatkan berkurangnya air intrasellular sehingga pembentukan kristal es intrasellular berkurang.¹³

Komponen terbesar penyusun lemak kuning telur adalah gliserida yang merupakan gabungan antara gliserol dan asam lemak. Mengacu pada komposisi penyusun kuning telur yang dikemukakan oleh Romanoff & Romanoff pada tahun 1963,⁷ yang menyatakan bahwa kandungan gliserol pada kuning telur angsa ternyata paling tinggi diikuti gliserol pada kuning telur bebek, dan terendah gliserol pada kuning telur ayam. Dengan demikian maka kandungan gliserol medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa adalah yang tertinggi dan diikuti medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek, medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam, dan medium m-TESTYC tanpa kuning telur.

Paparan gliserol sebagai *cryoprotectant* dalam medium terhadap spermatozoa selama 15 menit atau lebih pada temperatur ruang akan menyebabkan menurunnya motilitas spermatozoa. Turunnya motilitas spermatozoa disebabkan oleh efek "toksik" gliserol pada konsentrasi tinggi. Motilitas

spermatozoa menurun seiring dengan naiknya konsentrasi gliserol. Dampak merugikan dari paparan gliserol terhadap spermatozoa dapat dikurangi dengan cara pemberian gliserol dilakukan pada suhu rendah atau mengurangi konsentrasi gliserol yang digunakan atau dengan melakukan kedua hal tersebut sekaligus.³

Sebagai akibat dari sifat gliserol pada konsentrasi tinggi yang "toksik" terhadap motilitas spermatozoa, maka spermatozoa yang berada pada medium m-TESTYC dengan kuning telur tentunya akan lebih rendah motilitasnya dibanding dengan spermatozoa yang berada pada medium m-TESTYC tanpa menggunakan kuning telur. Pada penelitian ini, saat penambahan medium m-TESTYC pada sampel semen (yang menyebabkan spermatozoa terpapar gliserol) sampai saat dilakukan pengamatan motilitas spermatozoa tidak lebih dari 15 menit. Dengan demikian efek "toksik" gliserol pada motilitas spermatozoa setelah penambahan medium tidak terlihat. Disamping itu komponen medium m-TESTYC yang berupa kuning telur, Na-sitrat dan TES-Tris sebagai buffer, fruktosa sebagai sumber energi tidak merusak struktur dan fungsi spermatozoa. Dengan demikian dapat dimengerti bila motilitas spermatozoa yang berada dalam medium m-TESTYC dengan kuning telur tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan motilitas spermatozoa yang berada dalam medium m-TESTYC tanpa kuning telur. Berdasarkan hal tersebut dapat dipahami pula bila hasil pengamatan motilitas spermatozoa setelah penambahan medium yang disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 1 yang menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p > 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Proses pendinginan merupakan faktor fisik yang dapat menyebabkan mikrotubulus mengalami kerusakan yang mengakibatkan terhentinya gerakan cilia.¹⁴ Menurut pendapat Neischlag & Behre tahun 1996,¹⁵ kurangnya lengan *dynein* pada mikrotubulus dapat menyebabkan motilitas spermatozoa mengalami penurunan. Mengingat mikrotubulus dapat mengalami kerusakan pada proses pendinginan yang menyebabkan spermatozoa tidak dapat melakukan gerakan, maka pada pengamatan vitalitas spermatozoa dapat diperkirakan terdapat spermatozoa *viable* tetapi *immotil*. Dengan demikian dapat dikatakan proses simpan beku merupakan salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa. Bila hal tersebut terjadi, maka motilitas spermatozoa seluruh kelompok perlakuan akan mengalami penurunan yang relatif sama, mengingat semua sampel disimpan beku dengan temperatur dan tempat yang sama.

Sebagai *cryoprotectant*, gliserol mempunyai tiga sifat, yaitu dapat melewati membran secara pasif, dapat menggantikan air, tetapi pada konsentrasi yang tinggi bersifat toksik.¹¹ Menurut Critzer tahun 1988,³ perlu dibedakan antara sifat gliserol yang merupakan toksisitas bahan kimia sebenarnya dan suatu efek osmotik yang berhubungan dengan penambahan dan pengurangan gliserol.³ Toksisitas gliserol dapat dikurangi dengan menurunkan konsentrasi gliserol dalam medium. Penurunan konsentrasi gliserol dari 7,5 % sampai 5 % dapat meningkatkan motilitas spermatozoa *post thawing*.³ Konsentrasi gliserol yang dicampurkan dalam medium m-TESTYC adalah 6 %.⁴

Pada medium penyimpanan, kuning telur merupakan komponen yang berfungsi sebagai protektor.⁹ Menurut pernyataan Mortimer pada tahun 1994,² survival spermatozoa setelah simpan beku dapat dipertahankan dengan adanya kuning telur pada saat tidak adanya gliserol. Berdasarkan hal tersebut dapat diperkirakan efek “toksik” gliserol menyebabkan perbedaan motilitas spermatozoa *post freezing* akibat adanya perbedaan jenis kuning telur dalam medium. Hal ini mengingatkan semua komponen dalam medium m-TESTYC yang digunakan untuk simpan beku spermatozoa sama untuk semua perlakuan kecuali komponen kuning telur yang berbeda jenisnya antar kelompok perlakuan.

Fluiditas merupakan hal penting secara biologis bagi membran sel.⁸ Aktivitas enzim dan proses transport melalui membran akan terhenti bila struktur bilayer menjadi kaku. Fluiditas lipid bilayer membran sangat tergantung pada temperatur dan komposisinya. Pada temperatur rendah, rantai phospholipid pada membran berubah dari fase sol menjadi fase gel, perubahan tersebut disebut sebagai fase transisi. Hal ini yang menyebabkan membran sulit membeku. Disamping itu adanya ikatan ganda *cis* yang membentuk lekukan pada rantai hidrokarbon dan membuat rantai hidrokarbon sulit bersatu, sehingga membran tetap *fluid* pada temperatur rendah. Disamping phospholipid, lipid bilayer pada membran sel juga tersusun atas kolesterol. Pada konsentrasi rendah kolesterol menyebabkan membran sel menjadi kurang *fluid* tetapi pada konsentrasi yang tinggi, kolesterol mencegah rantai karbon bergabung sehingga mencegah membran menjadi kaku (*rigid*).^{8, 39}

Keberadaan kuning telur dalam medium m-TESTYC dengan kuning telur akan menyebabkan medium tersebut mengandung kolesterol. Keberadaan kolesterol pada kuning telur menyebabkan kandungan kolesterol pada medium m-TESTYC menjadi tinggi sehingga fluiditas membran dapat terjaga pada suhu rendah. Dengan demikian fluiditas membran dapat bertahan lebih lama pada proses penurunan suhu berlangsung, sehingga dehidrasi dapat berlangsung semaksimal mungkin. Hal tersebut mengakibatkan berkurangnya pembentukan kristal es intrasellular. Dengan berkurangnya kristal es intrasellular maka pembentukan kristal es yang lebih besar pada saat *thawing* juga berkurang, kematian sel juga berkurang.

Secara teoritis seharusnya medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa merupakan medium yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* tertinggi, sedangkan medium m-TESTYC tanpa kuning telur mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* yang terendah. Hipotesis ini dideduksi dengan adanya gliserol dalam kuning telur angsa yang secara matematis tertinggi menyebabkan gliserol dalam medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa tertinggi. Disamping hal tersebut jumlah kolesterol dalam kuning telur angsa juga tertinggi.

Hasil pengamatan spermatozoa *post freezing* pada Tabel 3 dan Gambar 1 membuktikan bahwa medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam justru mampu mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* tertinggi, sedang medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek dan medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post*

freezing lebih rendah. Medium m-TESTYC tanpa kuning telur mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* terendah. Kondisi ini kemungkinan disebabkan konsentrasi gliserol dalam medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek dan medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa cukup tinggi sehingga melampaui batas toksisitas gliserol, sedang gliserol dalam medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam kemungkinan berada pada konsentrasi optimum dan tidak melampaui batas toksisitas gliserol. Berdasarkan hal tersebut dapat dipahami bila medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* tertinggi, dan medium m-TESTYC tanpa kuning telur mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* terendah.

Senyawa yang mudah larut dalam lemak akan lebih mudah melewati membran.²⁵ Gliserol dalam medium merupakan substansi *permeating* yang dapat memasuki sel.^{3,22} Bila gliserol dapat melewati membran sel maka dimungkinkan gliserol juga dapat memasuki organella terutama mitokondria. Berdasarkan hal tersebut bila pengertian toksisitas gliserol mengacu pada sifat gliserol yang merupakan bahan kimia “toksik”, maka kemungkinan terganggu atau bahkan matinya mitokondria disebabkan oleh gliserol yang “toksik”. Gangguan pada mitokondria yang disebabkan oleh gliserol sebagai bahan kimia yang “toksik” dimungkinkan melalui beberapa cara antara lain menghambat sintesa protein, mengganggu proses oksidasi dan mempengaruhi enzim yang menyebabkan terganggunya proses fosforilasi. Tingkat gangguan mitokondria dapat diperkirakan tergantung pada tingkat konsentrasi gliserol yang masuk ke dalam

sel. Gangguan fungsi mitokondria akan menyebabkan motilitas spermatozoa mengalami penurunan.

Penelitian Mahadevan dan Trounson pada tahun 1983,²³ menunjukkan bahwa kombinasi 50 mM sukrosa dan 7,5 % gliserol sebagai *cryoprotectant* dalam medium simpan beku mendapatkan hasil tuaian motilitas spermatozoa *post thawing* lebih tinggi dibandingkan dengan motilitas spermatozoa *post thawing* yang disimpan beku dengan *cryoprotectant* gliserol saja dengan konsentrasi 7,5 %. Sukrosa dalam medium simpan beku merupakan substansi *non permeating*. Sebagai akibat dari terjadinya dehidrasi dan masuknya *cryoprotectant* ke dalam sel saat proses penurunan suhu berlangsung mengakibatkan osmolaritas intrasellular lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrasellular, maka pada saat *thawing* akan terjadi rehidrasi. Substansi *non permeating cryoprotectant* menyebabkan osmolaritas ekstrasellular meningkat sehingga akan mencegah terjadinya pembengkakan sel yang disebabkan oleh terjadinya proses rehidrasi.¹³ Penelitian lebih lanjut menunjukkan penggunaan substansi *non permeating* memberikan hasil yang lebih baik.³

Permeabilitas membran mitokondria terhadap air jauh lebih rendah dibandingkan dengan permeabilitas membran sel terhadap air. Akibatnya pada proses pendinginan air tertinggal di dalam mitokondria. Pada saat pembekuan terjadi, air yang tertinggal di dalam mitokondria membentuk kristal es yang menyebabkan mitokondria mengalami kerusakan.¹¹ Kerusakan tersebut pada akhirnya akan menurunkan laju pemecahan fruktosa oleh spermatozoa, dan

menurunkan *uptake* oksigen sehingga ATP berkurang setelah penuaian. Akibatnya energi yang akan dipakai untuk motilitas spermatozoa berkurang.⁹

Selain kematian mitokondria melalui mekanisme yang telah disebutkan di depan, kematian mitokondria dapat disebabkan oleh mekanisme lain. Mitokondria merupakan organella yang *osmotic active* yang dapat mengalami pembengkakan pada kondisi hipotonik dan mengalami pengkerutan pada kondisi hipertonik.²⁵ Pada perubahan hidropik, saat air memasuki sel organella di dalam sel termasuk mitokondria ikut menyerap air sehingga mengalami pembengkakan.⁴⁰ *Cryoprotectant* dalam medium m-TESTYC yang digunakan pada penelitian ini adalah gliserol yang merupakan substansi *permeating*. Disamping itu fruktosa yang merupakan sumber energi dapat juga berperan sebagai *cryoprotectant*, karena senyawa ini tidak dapat memasuki sel begitu saja maka, substansi ini merupakan substansi *non permeating*. Kemungkinan konsentrasi substansi *non permeating* pada medium m-TESTYC yang digunakan pada penelitian ini kurang tinggi, sehingga dampak merugikan dari proses rehidrasi mungkin dapat terjadi. Dengan demikian dapat dipahami bila mitokondria juga dapat mengalami pembengkakan selama proses rehidrasi pada saat *thawing*. Menurut Constantinides tahun 1993,¹⁴ pembengkakan mitokondria akan menyebabkan organella itu *rupture*. Dengan demikian dapat diperkirakan mitokondria mengalami kerusakan struktur dan atau fungsinya, yang menyebabkan motilitas spermatozoa mengalami penurunan. Hal tersebut merupakan kemungkinan yang dapat terjadi bila pengertian toksisitas gliserol mengacu pada efek osmotik gliserol. Dengan demikian nampaknya pengertian toksisitas gliserol cenderung

mengacu pada pengertian efek osmotik gliserol. Berdasarkan uraian tersebut di atas dapat dipahami bila motilitas spermatozoa *post freezing* antar kelompok perlakuan yang disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 1, menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), dan motilitas tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam, sedangkan kelompok perlakuan medium m-TESTYC tanpa kuning telur menunjukkan motilitas spermatozoa *post freezing* terendah.

Berdasarkan hal tersebut di atas hipotesis yang menyatakan motilitas spermatozoa *post freezing* yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC dengan kuning telur lebih tinggi dibandingkan dengan motilitas spermatozoa *post freezing* yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC tanpa kuning telur dapat diterima. Hipotesis yang menyatakan kuning telur angsa sebagai bahan baku medium m-TESTYC dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* tertinggi dibanding motilitas spermatozoa *post freezing* dari kelompok spermatozoa yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek atau medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam ditolak

6.2. Pengaruh penambahan medium *TES-Tris yolk citrat* terhadap vitalitas spermatozoa *pre freezing* dan *post freezing*

Hal yang menyebabkan hilangnya gerakan spermatozoa adalah gangguan metabolisme pembentukan energi, *defect* (kerusakan bawaan) aksonema, dan kematian spermatozoa itu sendiri.^{15,27} Bila gangguan metabolisme dan atau *defect*

aksonema tersebut terjadi pada spermatozoa, maka motilitas spermatozoa akan mengalami penurunan. Bila spermatozoa mati maka dapat dipastikan spermatozoa akan kehilangan motilitasnya.

Gangguan metabolisme pembentukan energi dan *defect* aksonema juga mempengaruhi vitalitas spermatozoa. Bila salah satu atau kedua hal tersebut terjadi pada spermatozoa, maka spermatozoa tersebut akan tetap vital (*viable*) tetapi *immotil*. Kematian spermatozoa itu sendiri juga merupakan hal yang mempengaruhi vitalitas spermatozoa. Prosentase proporsi vitalitas spermatozoa yang tinggi tetapi *immotil* menunjukkan adanya kerusakan struktural pada flagella.²⁶ Tabel 4 dan Gambar 1 menunjukkan data vitalitas spermatozoa lebih tinggi dari motilitas spermatozoa untuk semua perlakuan. Walaupun pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan ultra struktur dari ekor spermatozoa tetapi dengan melihat hasil pengamatan vitalitas spermatozoa setelah penambahan medium yang disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 1 dapat diperkirakan terdapat spermatozoa yang memiliki *defect* aksonema, sehingga terdapat spermatozoa *immotil* tetapi tetap *viable* (vital). Dengan demikian dapat dipahami bila data vitalitas spermatozoa lebih tinggi dari pada data motilitas spermatozoa.

Mengacu pada kondisi motilitas spermatozoa setelah penambahan medium yang menunjukkan efek paparan gliserol dalam medium terhadap spermatozoa tidak mempengaruhi motilitas spermatozoa. Dapat dikatakan efek paparan gliserol terhadap spermatozoa juga tidak mempengaruhi vitalitas spermatozoa. Dengan

demikian dapat dipahami bila vitalitas spermatozoa antar kelompok perlakuan yang disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 1 tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$).

Menurut Underwood tahun 1994,⁴¹ pembekuan sel merupakan faktor mekanik yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel karena terbentuknya kristal es. Disamping itu, kerusakan struktur dan fungsi mitokondria yang disebabkan oleh efek “toksik” gliserol kemungkinan tidak sekedar membuat spermatozoa menurun motilitasnya tetapi sampai menyebabkan kematian spermatozoa. Walaupun pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan ultra struktur mitokondria dan membran sel namun berdasarkan pengamatan vitalitas spermatozoa *post freezing* yang menunjukkan tingginya kematian spermatozoa *post freezing*, kemungkinan spermatozoa mengalami kematian akibat kerusakan yang hebat pada struktur dan fungsi mitokondria dan membran sel. Bila spermatozoa mati maka dapat dipastikan spermatozoa akan kehilangan vitalitasnya. Mengingat menurunnya motilitas seiring dengan kenaikan konsentrasi gliserol, maka dapat diperkirakan semakin tinggi konsentrasi gliserol efek “toksik” gliserol semakin meningkat. Konsentrasi gliserol dalam medium simpan beku umumnya sekitar 7,5 % (v/v) dengan konsentrasi efektif dalam medium 7 %.^{1,2} Pada penelitian ini konsentrasi gliserol dalam medium m-TESTYC yang digunakan sekitar 6 %. Dengan demikian dapat dipahami bila hasil pengamatan vitalitas spermatozoa yang disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 1 menunjukkan medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam dapat mempertahankan vitalitas spermatozoa tertinggi ($p < 0,05$), diikuti dengan

medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek dan medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa, serta terendah medium m-TESTYC tanpa kuning telur.

Tuaian spermatozoa *post freezing* pada medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam menunjukkan hasil motilitas yang tertinggi dibandingkan dengan medium m-TESTYC yang lain (seperti tertera pada Tabel 3). Dengan berpedoman bahwa uji vitalitas dapat digunakan untuk mengetahui akurasi motilitas spermatozoa, maka dengan demikian vitalitas spermatozoa *post freezing* pada medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam juga menunjukkan angka yang tertinggi.

Berdasarkan uraian tersebut di atas hipotesis yang menyatakan vitalitas spermatozoa *post freezing* yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC dengan kuning telur lebih tinggi dibandingkan dengan vitalitas spermatozoa *post freezing* yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC tanpa kuning telur diterima. Hipotesis yang menyatakan kuning telur angsa sebagai bahan baku medium m-TESTYC dapat mempertahankan vitalitas spermatozoa *post freezing* tertinggi dibanding motilitas spermatozoa *post freezing* dari kelompok spermatozoa yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek atau medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam ditolak.

6.3. Pengaruh penambahan medium *TES-Tris yolk citrat* terhadap morfologi spermatozoa *pre freezing* dan *post freezing*

Proses yang terjadi pada *pars proximalis epididymis* adalah spermatozoa mendapatkan kemampuan untuk memfertilisasi sel telur, yang dikenal sebagai proses maturasi spermatozoa. Proses tersebut berhubungan dengan perubahan fisiologi, biokimia dan morfologi.¹⁵ Dengan demikian morfologi normal dan abnormal spermatozoa sudah terbentuk sejak spermatozoa berada pada epididymis. Dengan demikian pengamatan jumlah morfologi spermatozoa normal baik sebelum dan sesudah penambahan medium maupun setelah simpan beku tidak mengalami perubahan kecuali dalam medium hipotonis atau hipertonis kuat. Mengacu pada kondisi motilitas dan vitalitas spermatozoa setelah penambahan medium m-TESTYC tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan motilitas dan vitalitas spermatozoa pada medium m-TESTYC tanpa kuning telur, sehingga dapat diperkirakan struktur dan fungsi spermatozoa tidak mengalami gangguan yang bermakna. Hal tersebut di atas merupakan kemungkinan pertama yang menyebabkan morfologi spermatozoa *post freezing* tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan ($p > 0,05$), yang ditunjukkan pada hasil pengamatan morfologi spermatozoa *post freezing* pada Tabel 5. dan Gambar 1.

Price & Wilson tahun 1995,⁴⁰ menyatakan bahwa gangguan yang hebat pada sel menyebabkan kerusakan yang *irreversible* sehingga sel akan mengalami kematian yang sulit diketahui dengan pengamatan morfologi sel. Bila sel yang mengalami kematian dibiarkan dalam waktu yang lebih lama maka kematian tersebut baru memperlihatkan perubahan morfologi yang dapat diketahui. Sesuai

pernyataan tersebut, pada penelitian ini, saat penambahan medium sampai saat spermatozoa membeku dan saat dilakukan *thawing* sampai saat pengamatan morfologi spermatozoa waktunya relatif singkat, sehingga apapun yang menyebabkan kematian spermatozoa belum dapat mengubah morfologi spermatozoa. Dengan demikian pada pengamatan morfologi spermatozoa terlihat spermatozoa yang mengalami kematian tersebut berbentuk seperti morfologi spermatozoa normal yang lain. Hal tersebut di atas merupakan kemungkinan kedua yang menyebabkan morfologi spermatozoa *post freezing* tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan ($p > 0,05$), yang ditunjukkan pada hasil pengamatan morfologi spermatozoa *post freezing* pada Tabel 5. dan Gambar 1.

Akibat dehidrasi dan masuknya gliserol sebagai *permeating cryoprotectant* ke dalam spermatozoa yang terjadi pada saat penambahan medium sampai saat pembekuan, maka osmolaritas spermatozoa lebih tinggi dibandingkan osmolaritas medium disekelilingnya. Hal tersebut menyebabkan terjadinya rehidrasi pada saat *thawing*, sehingga dapat menyebabkan volume sel bertambah. Spermatozoa yang mengalami kematian mengalami kenaikan permeabilitas membran.⁹ Selanjutnya menurut Price & Wilson tahun 1995, selama dapat bertahan pada kondisi pembengkakan, bila sel tersebut tidak pecah maka dapat kembali pada kondisi normal.⁴⁰ Dengan adanya fruktosa yang merupakan substansi *non permeating*, akan mempertahankan osmolaritas medium di luar sel, sehingga kemungkinan spermatozoa mengalami pembengkakan sangat kecil. Pembengkakan pada spermatozoa *post freezing* kemungkinan dapat juga terjadi namun hal tersebut tidak terdeteksi pada saat pengamatan, karena pengamatan morfologi spermatozoa

tidak dilakukan dengan klasifikasi *Tygerberg strict criteria* yang menggunakan pedoman ukuran spermatozoa. Dengan demikian pada pengamatan morfologi, spermatozoa yang mengalami pembengkakan tersebut sebelum berbentuk coiling, dihitung sebagai morfologi spermatozoa normal. Hal tersebut di atas merupakan kemungkinan ketiga yang menyebabkan morfologi spermatozoa *post freezing* tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan ($p > 0,05$), yang ditunjukkan pada hasil pengamatan morfologi spermatozoa *post freezing* pada Tabel 5. dan Gambar 1.

Menurut Underwood tahun 1995,⁴¹ kerusakan akibat trauma mekanik yang parah adalah robeknya membran sel sehingga menyebabkan sitoplasma keluar. Walaupun pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan ultra struktur membran sel, namun mengacu pernyataan tersebut di atas kemungkinan kerusakan membran sel spermatozoa cukup parah, sehingga menyebabkan sitoplasma sel keluar. Pada saat pengamatan morfologi spermatozoa, terlihat bagian kepala spermatozoa yang sitoplasmanya keluar akan mengalami pengkerutan. Jika pengkerutan hebat maka kepala spermatozoa akan berbentuk seperti spermatozoa berkepala *pinhead* atau bahkan kepala spermatozoa tidak nampak lagi. Spermatozoa dengan kepala berbentuk seperti spermatozoa berkepala *pinhead* atau spermatozoa tak berkepala menurut Mortimer tahun 1994,² dalam penghitungan prosentase morfologi tidak dihitung sebagai spermatozoa. Dengan demikian spermatozoa *post freezing* yang mengalami plasmolisis tidak dihitung sebagai spermatozoa. Hal tersebut di atas merupakan kemungkinan keempat yang menyebabkan morfologi spermatozoa *post freezing* tidak berbeda bermakna antar

kelompok perlakuan ($p > 0,05$), yang ditunjukkan pada hasil pengamatan morfologi spermatozoa *post freezing* pada Tabel 5. dan Gambar 1.

Kemungkinan kelima adalah jika kerusakan membran spermatozoa ringan maka jika terjadi rehidrasi air akan keluar lagi melalui membran yang rusak sehingga tidak terjadi pembengkakan dan pada pengamatan morfologi, bentuk spermatozoa tersebut seperti bentuk spermatozoa normal.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, hipotesis yang menyatakan morfologi spermatozoa *post freezing* yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan morfologi spermatozoa *post freezing* yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC tanpa kuning telur diterima, dan hipotesis yang menyatakan kuning telur angsa sebagai bahan baku medium m-TESTYC yang mempertahankan morfologi spermatozoa *post freezing* tidak berbeda bermakna dibanding morfologi spermatozoa *post freezing* dari kelompok spermatozoa yang disimpan beku dengan menggunakan medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek atau kuning telur ayam juga diterima.

VII. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* tertinggi dibanding dengan medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa, medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek, dan medium m-TESTYC tanpa kuning telur.
2. Medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam mempertahankan vitalitas spermatozoa *post freezing* tertinggi dibanding dengan medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa, dan medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek, medium m-TESTYC tanpa kuning telur.
3. Medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam mempertahankan morfologi spermatozoa *post freezing* tidak berbeda nyata dibanding dengan medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa, medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek, dan medium m-TESTYC tanpa kuning telur.

7.2. SARAN

Berdasar hasil penelitian ini dapat disarankan pada penelitian selanjutnya untuk mengetahui penyebab berkurangnya motilitas spermatozoa setelah simpan beku dilakukan pengamatan ultra struktur mikrotubulus pada ekor spermatozoa dan ultra struktur mitokondria. Selanjutnya untuk mengetahui kondisi morfologi spermatozoa perlu dilakukan pengamatan ultra struktur membran spermatozoa.

VIII. RINGKASAN

Simpan beku semen (*semen cryopreservation*) merupakan penyimpanan semen pada suhu sangat rendah dalam nitrogen cair. Metode tersebut digunakan untuk menanggulangi masalah dalam reproduksi, antara lain untuk menanggulangi kemoterapi pada kasus keganasan, tindakan pengamanan terhadap spermatozoa sebelum vasektomi, simpan beku juga diperlukan sebagai sarana pendukung (*back up*) laboratorium teknik bantu reproduksi (*Assisted Reproductive Techniques/ART*).

Hal yang perlu dipertimbangkan dalam simpan beku semen adalah pemilihan medium simpan beku. Medium yang digunakan untuk simpan beku semen tidak selalu sama mengingat adanya variabilitas dari spermatozoa. Penelitian Prins & Weidel tahun 1986 menunjukkan medium TES-Tris Egg Yolk Citrat (TESTYC) dapat mempertahankan motilitas spermatozoa post freezing 83 % dari *pre freezing*. Kuning telur ayam merupakan salah satu komponen medium TESTYC yang bersama dengan gliserol berfungsi sebagai protektor membran. Medium TESTYC selalu menggunakan kuning telur ayam, namun tidak dikemukakan mengapa kuning telur ayam yang digunakan dan bukan jenis kuning telur yang lain.

Komponen kuning telur unggas yang dominan setelah air adalah lemak, yang bervariasi kuantitasnya menurut jenisnya. Kandungan lemak dalam kuning telur ayam 32,6 %, kuning telur bebek 35,2 % sedangkan kuning telur angsa 36 %. Gliserida merupakan komponen tertinggi penyusun lemak kuning telur.

Gliserida pada kuning telur tersusun atas gliserol dan asam lemak. Gliserol merupakan *cryoprotectant* yang paling umum pada simpan beku semen manusia. Disamping itu, di dalam lemak kuning telur juga terdapat kolesterol yang dapat mempertahankan fluiditas membran sel sehingga mencegah kerusakan sel akibat penurunan suhu. Kuning telur angsa secara matematis memiliki kandungan gliserol, asam lemak dan kolesterol tertinggi dibandingkan dengan kuning telur bebek atau kuning telur ayam, sehingga dimungkinkan akan lebih baik bila digunakan sebagai bahan baku medium modifikasi dari *TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) yang dapat mempertahankan motilitas, vitalitas, dan morfologi spermatozoa *post freezing*. Permasalahan yang timbul medium m-TESTYC dengan bahan baku jenis kuning telur apakah yang dapat mempertahankan motilitas, vitalitas, dan morfologi spermatozoa manusia *post freezing* tertinggi.

Berdasarkan hal tersebut di atas maka dilakukan penelitian yang bertujuan menganalisa perbedaan motilitas, vitalitas, dan morfologi spermatozoa yang disimpan beku dengan menggunakan medium *modified TES-Tris yolk citrat* (m-TESTYC) dengan dan tanpa kuning telur. Sampel yang digunakan pada penelitian ini berasal dari 30 pria dewasa yang dikoleksi dengan cara masturbasi setelah abstinensi selama 3 - 5 hari. Pengamatan sebelum perlakuan meliputi motilitas, vitalitas dan morfologi spermatozoa. Seluruh sampel kemudian dibagi menjadi 4 kelompok dan ditambahkan medium m-TESTYC tanpa kuning telur (blanko) sebagai kontrol (perlakuan A), medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam (perlakuan B), medium m-TESTYC dengan kuning telur bebek (perlakuan C), medium m-TESTYC dengan kuning telur angsa (perlakuan D). Penambahan

medium dengan perbandingan 1 : 1. Semua sampel disimpan dalam nitrogen cair pada suhu - 196 °C selama 2 minggu, kemudian dilakukan *thawing* dan diamati motilitas, vitalitas dan morfologinya. Rancangan penelitian ini menggunakan *Randomized pre-test and post-test control group design*. Data yang terkumpul diuji dengan metode statistik Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney U. Pada penelitian ini hasil tuaian spermatozoa *post freezing* yang disimpan beku dalam medium m-TESTYC dengan kuning telur ayam dapat mempertahankan motilitas dan vitalitas tertinggi dari seluruh kelompok perlakuan, sedang morfologi spermatozoa *post freezing* ternyata tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan.

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi tentang penggunaan berbagai jenis kuning telur sebagai bahan baku medium simpan beku spermatozoa manusia. Disamping itu juga memberikan dasar penggunaan kuning telur dari jenis tertentu sebagai bahan baku medium simpan beku bagi spermatozoa manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winarso, H. & Hinting, A. Simpan beku sperma manusia. Surabaya. Post graduate course Penatalaksanaan infertilitas pria dan analisis semen. FK Unair. 1999 : 1 – 13.
2. Mortimer D. Practical laboratory andrology. New York Oxford University Press. 1994; 301 –320.
3. Critzer, J.K., A.R. Huse-Benda, D.V. Aaker, B.W. Arneson, G. David Ball. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The Effect of Cryoprotectant on Motility. *Fertil Steril*. 1988 : 50(2) : 314-320.
4. Weidel L., and G.S. Prins. Cryosurvival of Human Spermatozoa Frozen in Eight Different Buffer Systems. *J. Androl*. 1987 : 8 : 41 – 47.
5. Prins, G.S. & L. Weidel. A comparative study of buffer system as cryoprotectant for human spermatozoa. *Fertil. Steril*. 1986 : 46 : 147 – 149.
6. Hallack J., R.S. Sidhu, A.J. Thomas Jr. Effect of test yolk buffer and glycerol cryoprsvation on human speramtozoa morphology and function. ASRM Abstracts. 1996
7. Romanoff A.L., Anastasia J. Romanoff. The avian egg. 2nd Edition. New York. John Willey & Sons Inc. 1963 : 311 – 343.
8. Alberts, B., D. Ray, J. Lewis, K. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. Molecular Biology of the cell. 3rd Edition. New York. Garland Publishing Inc. 1994 : 483 – 502.

9. Hafez, E.S.E. *Reproduction in Farm Animals*. 2nd Ed. Philadelphia. Lea & Febiger. 1968 : 51 - 56.
10. Critzer, J.K., A.R. Huse-Benda, D.V. Aaker, B.W. Arneson; G. David Ball. Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 1987 : 47 : 656 – 663.
11. Henry, M.A., E.E. Noiles, D. Gao, P. Mazur, J.K. Critzer. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effect of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil. Steril.* 1993 : 60 (5) : 911 – 917.
12. Mazur P. The Role of intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates. *J. Cryobiology.* 1977 : 14 : 251-272
13. Wetzels, A.M.M. *IVF Laboratory aspects of in-vitro fertilization*. Netherlands. N.V. Organon. 1996 : 228 – 240.
14. Constatinides, P. *General Pathology*. Connecticut. Appleton & Lange. 1993 : 39 – 42.
15. Nieschlag, E., & H.M. Behre, *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Berlin. Springer Publ. 1996 : 65 – 105
16. Guyton, A.C. *Fisiologi Manusia*. Penerjemah Petrus Adrianto, EGC . Jakarta, 1991 : 1 – 7.
17. Girraud, M.N., C. Motta, D. Boucher, and G. Grizard. Membrane fluidity predicts the outcome cryopreservation of human spermatozoa. *J. Hum. Reproduction.* 2000 : 15 (10) : 2160 - 2164.

18. Yogev L, R. Gamzu, G. Paz, S. Kleiman, A. Botchan, R. Hanser and H. Yavetz. Pre-freezing sperm preparation does not impair thawed spermatozoa binding to the zona pellucida *J. Human Reproduction* 1999 : 14 (1) : 114 – 117.
19. Devireddy, R.V., David J. Swanlund, Kenneth P. Roberts, John C. Bischof. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents, *Biol. Reprod.* 1999 : 61 : 764 - 775.
20. Devireddy, R.V., David J. Swanlund, Kenneth P. Roberts, John L. Pryor, John C. Bischof. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *J. Hum. Reprod.* 2000 : 15 (4) : 1125 - 1135.
21. Ganong, W.F., Fisiologi Kedokteran. Penerjemah Jauhari Wijayakusuma. Edisi 17. Jakarta. EGC. 1995 : 30 – 31
22. Gao, D.Y., E. Ashworth, P.F. Watson, F.W. Kleinhaars, P. Mazur, J.K. Critzer. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa : separate effects of glycerol, NaCl and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 1999 : 14 : 1013 – 1021.
23. Mahadevan M., Trounson A. O. Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. *J. Andrologia.* 1983 : 15 (4) : 355 - 366.
24. Johnson M., B. Everitt, Essential Reproduction. 3rd Edition. Oxford. Blackwell scientific Publ. 1988 : 52-62.

25. Karp G., Cell and Molecular Biologi Concepts and Experiments. New York. John Wiley & Sons, INC. 1996 : 177-179
26. Anonim. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm- cervical mucus interaction. 4th Ed. United Kingdom. Cambridge University Press. 1999.
27. Polcz T.E., J.B. Stronk, G.B. Huszar. Repeated Cryopreservation of Ejaculated Human Spermatozoa, Recovery and Maintenance of Sperm Motility and Viability. 1996. ASRM Abstract.
28. Spano M, E. Cordell, G. Leter, F. Lombardo, A. Lenzi, and L. Gandini. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Molecular. J. Human Reproduction*. 1999 ; 5 (1) : 29 – 37.
29. Menkveld R. T.F. Kruger. Basic semen analysis. In : Acosta A.A., and Thinus F. Kruger. Human spermatozoa in assisted reproduction. 2nd Edition. London : The Parthenon Publishing Group. 1996 : 53 – 67.
30. Baker, H.W.G. Computer-aided semen analysis. Dept. Obstr. Gyn. Victoria Univ. Melbourne.. 1999 : 1 – 4.
31. Fessenden R.J. & J.S. Fessenden. Dasar-Dasar Kimia Organik. Penerjemah Sukmariah Maun, Kamiyati Anas, Tilda S Sally. Jakarta. Binarupa Aksara. 1997 : 621- 624.
32. Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. Biokimia Harper. Penerjemah Andreas Hartono. Edisi 24. Jakarta. EGC. 1996 : 151 – 163.

33. Pratiknya A.W. Dasar-dasar metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan kedua. Jakarta. Raja Grafindo Persada. 1993 : 134 – 160.
34. Walpole, R.E. & R.H. Myers. Ilmu peluang dan statistika untuk insinyur dan ilmuwan. Penerjemah R.K. Sembiring. Edisi ke-4. Bandung. Penerbit ITB. 1995 : 45 – 52.
35. Wibowo, S. Studi tentang spermatozoa yang tercemar oleh mikroorganisme pada pasangan infertil. Surabaya. Disertasi UNAIR. 1989
36. Wibowo, S. Differentiation of four taxa of the *Anopheles balabacensis* complex using H-banding pattern in the sex chromosom (Diptera : Lulicidae). Canadian J. of Genetic & Cytology. 1986 : 26 : 425 – 429
37. Nazir, M. Metode penelitian. Jakarta. Ghalia Indonesia. 1988 : 284 - 305.
38. Santoso Singgih. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta : PT Elex Media Komputindo, 1999: 300 – 380.
39. Anonim. Cell Membrane. <http://www.altavista.com>.2000.
40. Price, S.A., & L.M. Wilson Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit. Penerjemah Peter Anugrah. Edisi 4. Jakarta. EGC 1995 : 22-28
41. Underwood, J.C.E., Patologi Umum dan Sistematis. Penerjemah Sarjadi. Edisi 1 Jakarta. EGC. 1994 : 115-120.