

5/3.212
Jusup
E

**EFEK PENAMBAHAN ADENOSIN 5'-TRIFOSFAT (ATP)
IN-VITRO DALAM MENINGKATKAN KUALITAS
MOTILITAS SPERMATOZOA**

*(The Effect of adding adenosine 5' triphosphat in-vitro to increase the motility of
spermatozoa)*



Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2

Magister Ilmu Biomedik

Innawati Jusup
NIM.G4 A 097 005

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

TESIS

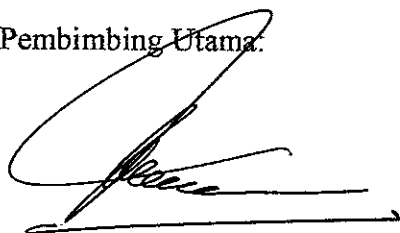
**EFEK PENAMBAHAN ADENOSIN 5 '-TRIFOSFAT (ATP)
IN-VITRO DALAM MENINGKATKAN KUALITAS
MOTILITAS SPERMATOZOA**

disusun oleh
Innawati Jusup
G A 097005

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada tanggal 8 Oktober 2002
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi pembimbing

Pembimbing Utama:



Prof. dr. NOOR PRAMONO, M Med Sc, SpOG(K)
NIP. 130 345 800

Pembimbing kedua:

dr. Priyono S Hadiloewih, SpAnd
NIP. 130 345 801

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik



Prof. dr. H. Soebowo, Sp. PA (K)
NIP. 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Oktober 2002



Inawati Jusup
G4A 097005

Daftar Riwayat Hidup

Nama : dr. Innawati Jusup
Tempat/Tgl. Lahir : Semarang, 29 Juli 1963
Agama : Kristen
Kewarganegaraan : Indonesia
Jenis Kelamin : Perempuan
Status Perkawinan : Menikah dengan Dani Puspwardojo
Anak : Ivana (11 tahun), Johan (10 tahun), Irena (8 tahun)
Alamat pekerjaan : Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
Bagian Biokimia
Jl. Dr. Sutomo 18 Semarang, Indonesia.
Telp. 62-024-8451809
Alamat Rumah : Jl. Brigjen Katamso 7 Semarang, Indonesia.
Telp. 62-024-8314992.
Jabatan : Staf pengajar

Riwayat Pendidikan:

No Pendidikan	Nama sekolah	Tahun lulus
1	Sekolah dasar Kristen I	1976
2	Sekolah lanjutan Tingkat Pertama Masehi II	1979
3	Sekolah lanjutan Tingkat Atas Kristen	1981
4	Perguruan Tinggi UNDIP Dokter	1990

Riwayat Pekerjaan:

No	Nama Instansi	Jabatan	Masa Jabatan
1	Laboratorium Sabdo Rahayu	Penanggung Jawab	1990 -1994
2	ST. Reagensia	Sekretaris	1991- 1992
1	RSU Panti Wilasa II, Semarang	Dokter jaga / UGD	1990 -1991
2	Poliklinik Yakiba	Dokter Utama	1990 -1991
3	Poliklinik Siloam	Dokter Pengganti	1991
4	Puskesmas Kalipancur, Kab Pekalongan	Kepala Puskesmas	1992 -1994
5	Fakultas Kedokteran, UNDIP	1. Dosen Biokimia 2. Koordinator Pendidikan	1994 - sekarang 1999 - sekarang

Tulisan Ilmiah:

Judul		Tahun
1. Biokimia Jaringan	Lecture note	2000
2. Purin dan Pirimidin	Lecture note	2000
3. Praktikum Karbohidrat	Penuntun	1995
4. ATP sebagai energi	Praktikum Makalah ilmiah	1999
5. Uji beda motilitas spermatozoa dengan penambahan digoksin dibanding dengan penambahan kombinasi digoksin ATP secara in-vitro	Penelitian (pembimbing)	2001
6. Uji beda motilitas spermatozoa dengan penambahan pentoksifilin dibandingkan dengan penambahan ATP secara in-vitro	Penelitian (pembimbing)	2001
7. Motor Molekuler	Lecture note	2002

DAFTAR ISI

	halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
ABSTRAK	vi
I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	
1.2. Rumusan Masalah	
1.3. Tujuan Penelitian	
1.4. Manfaat Penelitian	
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Motilitas spermatozoa	
2.2. Adenosin 5' Trifosfat (ATP)	
2.3. Struktur Anatomi Spermatozoa	
2.4. Motor Molekuler Ekor Spermatozoa	
2.5. Struktur Molekuler Membran Sel	
2.6. Plasma Semen	
2.7. Kerja Kenetik ekor spermatozoa	
III KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS	17
3.1. Kerangka Teori	
3.2. Kerangka Konsep	
3.3. Hipotesis	
3.4. Keterbatasan Penelitian	
IV METODOLOGI PENELITIAN	19
4.1. Rancangan Penelitian	
4.2. Populasi, Sampel dan Jumlah Sampel	
4.3. Variabel Penelitian	
4.4. Alat dan Bahan	

4.5. Strategi Penelitian	
4.6. Analisa data	
V HASIL PENELITIAN	26
5.1. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa kategori A	
5.2. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa Kategori A, B, dan D	
VI PEMBAHASAN	34
6.1. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa Kategori A	
6.2. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa Kategori B	
6.3. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa Kategori C	
6.4. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa Kategori D	
VI SIMPULAN DAN SARAN	36
7.1. Simpulan	
7.2. Saran	
Daftar Pustaka	
Lampiran	

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang, karena berkat rahmat dan karunia-Nya kami dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini, yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Master pada program Magister Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.

Pemilihan judul penulisan ini timbul dimana penulis ingin memberikan informasi kemudahan pengelolaan pasangan infertilitas dengan pemilihan 'metode reproduksi bantuan' khususnya pada pria dengan gangguan motilitas yang kurang, dengan penambahan ATP akan meninggalkan kualitas spermatozoa.

Penulisan tesis ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak, maka dalam kesempatan ini kami mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran UNDIP atas ijin yang diberikan kepada kami untuk mengikuti pendidikan Program Pasca Sarjana.

Rektor Universitas Diponegoro, yang telah memberikan beasiswa dan memberikan dana penelitian melalui program BPPS.

Ketua Program Studi Magister Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, yang telah banyak membantu memberi kesempatan, saran dan sarana selama menyelesaikan pendidikan.

Prof. dr. NOOR PRAMONO, M Med Sc, SpOG., Selaku pembimbing utama, yang banyak memberikan bimbingan, dukungan dan wawasan selama penulisan tesis ini.

dr.Priyono S Hadiloewih, SpAnd, Selaku pembimbing, yang memberikan bimbingan, dukungan dan dorongan dalam menyelesaikan penulisan tesis ini.

Dr Juwono, dr Pudjadi SU, drg Henry Setyawan MSc, selaku penguji tesis

Dr. Andrew Johan, Msc, dr Listyani Suromo, PK, selaku nara sumber

Kepala Bagian Biokimia FK UNDIP, yang telah memberikan ijin, mengikuti Program Pasca Sarjana, dan seluruh staf Biokimia atas dukungan dan dalam memberi semangat.

Bagian Biologi FK UNDIP (Laboratorium Andrologi) dan Klinik Infertilitas RS dr Kariadi, terima kasih atas segala bantuan yang diberikan dalam pemeriksaan pasien dan pengambilan sampel semen.

Direktur RS. Telogorejo dan Staf bagian Laboratorium dan Klinik Infertil yang telah memberikan ijin menggunakan alat dan tempat laboratorium.

Ayah saya dr. A J Sudono (almarhum) dan ibu saya Yulianti Puspa yang telah membesarkan, mendidik saya, serta do'a restunya.

Suamiku tercinta Dani Puspowardojo, terima kasih atas dukungan moril, material, pengertian dan memberi semangat selama saya menempuh pendidikan. Untuk buah hatiku Ivana, Johan dan Irena terima kasih atas dukungan dan doa-nya, sehingga penelitian dan penulisan tesis ini dapat selesai.

Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu, yang telah membantu kami sehingga selesainya penulisan tesis ini.

Semoga Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang membalas segala budi baik yang telah diberikan kepada kami.

Semarang, Oktober 2002

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Motilitas spermatozoa (A, B, C, dan D) menurut kelompok intervensi.....	26
Tabel 2. Mean dan Median serta Uji Normalitas perubahan A, B, C, dan D sebelum dan sesudah intervensi.....	31
Tabel 3. Pengaruh pemberian ATP terhadap perubahan motilitas kategori A (uji Mann -Whitney).....	32
Tabel 4. Pengaruh pemberian ATP terhadap perubahan motilitas kategori B, C, dan D (t-test).....	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur kimia ATP	8
Gambar 2.2. Struktur ekor spermatozoa	10
Gambar 2.3. Bagan dari bagian mikrotubulus ekor spermatozoa ...	16
Grafik 1. Distribusi motilitas spermatozoa kategori A menurut kelompok intervensi	27
Grafik 2. Distribusi motilitas spermatozoa kategori B menurut kelompok intervensi	28
Grafik 3. Distribusi motilitas spermatozoa kategori C menurut kelompok intervensi	28
Grafik 4. Distribusi motilitas spermatozoa kategori D menurut kelompok intervensi	29

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1: Analisis Statistik

LAMPIRAN 2: Laporan Penelitian Pendahuluan tentang :
Kadar ATP yang akan ditambahkan

LAMPIRAN 3: Harga Normal analisis spermatozoa (WHO)

Abstract

The Effect of adding adenosine 5 tri'riphosphat in-vitro to increase the motility of spermatozoa

Background:

The quality of spermatozoa is determined by its motility. Classification of spermatozoa according to WHO categories: A, B, C, and D. ATP is needed by spermatozoa to move forward.

Objective:

To prove that supplemented ATP could increase the motility of spermatozoa

Design:

This experimental research was designed as pre and posttest randomized control design study.

Sample:

Samples were obtained from 46 healthy people who fulfilled the inclusion criteria: 30 – 45 years of age, normosperm, they did not consume alcohol, coffee and 'jamu' three days before the test.

Method:

The sample were randomly divided into two groups, 23 samples each group. The first group was treated with ATP and the second group was kept without ATP. The motility of spermatozoa was measured before and 15 minutes after 7µg/ml ATP treatment. They were grouped as A, B, C and D category according to WHO categories.

Result:

It was found in the study, ATP treatment could increase the motility quality of spermatozoa in-group A ($p=0,008$) and ($p=0,011$) and also group D ($p=0,002$). No significant difference in motility quality was found in-group C ($p=0,25$).

Conclusion:

The semen treated by adding ATP could increase the motility of spermatozoa.

Key words: *Motility Category A-B-C-D, ATP, spermatozoa.*

Abstrak

Efek penambahan adenosin 5' trifosfat in-vitro dalam meningkatkan kualitas motilitas spermatozoa

Latar belakang

Kualitas spermatozoa yang baik ditentukan pada motilitas spermatozoa. ATP sangat dibutuhkan sebagai sumber energi penggerak ekor spermatozoa. Penambahan ATP di dalam semen diharapkan mengakibatkan mekanisme perlekatan dinein dan mikrotubulus berlangsung lebih lama, sehingga dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.

DESAIN:

experimental, randomized controlle pre test and posttest design.

Pengukuran :

Mengukur motilitas menurut kategorinya A, B, C, dan D (WHO). Alat 'bilik Makler'

Sampel :

46 sampel pria dewasa yang memenuhi kriteria inklusi: pria usia 30-45 tahun, normospermia. Kriteria eksklusi: peminum alkohol, kopi, ekstrak jamu kuat lelaki.

Metode:

46 sampel semen manusia dibagi menjadi 2 kelompok, masing-masing 23 sampel. Kelompok pertama ditambahkan ATP 7 $\mu\text{g/ml}$, dan kelompok yang lain tanpa penambahan ATP. Motilitas spermatozoa dihitung pada saat penambahan ATP dan 15 menit setelah penambahan ATP dengan menggunakan kriteria WHO.

HASIL:

Pada uji statistik, pada kelompok kategori A ($p = 0,008$), kategori B ($p = 0,011$), dan kategori D ($p = 0,002$) ada peningkatan motilitas yang bermakna dibandingkan kelompok tanpa penambahan ATP, sedangkan pada kelompok kategori C ($p = 0,25$), terjadi peningkatan motilitas tetapi tidak bermakna dibanding kelompok C tanpa penambahan ATP.

Simpulan:

Pemberian ATP secara in-vitro dapat meningkatkan kualitas motilitas spermatozoa (kategori A dan B)

Kata kunci : motilitas kategori A-B-C-D, spermatozoa, dinein.

Bab I

Pendahuluan

1.1. Latar Belakang Masalah

Konsepsi dapat terjadi bila spermatozoa bergerak (motil) melakukan 'perjalanan' panjang dalam saluran reproduksi wanita hingga berhasil menembus sel telur. Jumlah spermatozoa motil merupakan salah satu parameter dari fungsi spermatozoa dalam mengukur keberhasilan konsepsi. Sedangkan motilitas spermatozoa menjadi sangat penting dalam menentukan tingkat kesuburan pada laki-laki. Pergerakan spermatozoa ini membutuhkan zat yang dapat menghasilkan energi untuk bergerak yaitu adenin 5-trifosfat (ATP). Kualitas spermatozoa yang baik akan mampu bergerak melewati rintangan lendir serviks, uterus, tuba pada wanita pasangannya serta menembus sel kumulus dan zona pelusida untuk membuahi sel telur dan terjadilah konsepsi¹.

Suatu penelitian menyebutkan diantara pasangan usia subur, sekitar 10-15% mempunyai problem belum hamil dalam waktu satu tahun meskipun telah melakukan senggama secara teratur tanpa menggunakan kontrasepsi. Kelompok ini disebut dengan pasangan infertil. Penyebab gangguan infertilitas dari pria sama dengan wanita, yaitu 40 %. Gangguan kesuburan pada pria yang sering dihadapi pasang infertil adalah jumlah spermatozoa motil yang tidak memenuhi syarat untuk pembuahan secara alami in-vivo, maka dikembangkan metode reproduksi secara in-vitro seperti *Inseminasi Intra Uterin* (IIU), *Fertilisasi In-Vitro* (FIV) dan *Tandur Alih Gamet Intratuba* (TAGIT). IUI merupakan 'teknik reproduksi bantuan' dengan cara memasukkan sperma yang telah dikoreksi secara khusus langsung ke dalam kavum uteri dengan suatu alat. Program ini diindikasikan bagi pria subfertil. Sedangkan FIV merupakan teknik alat bantu atau teknik rekayasa reproduksi dengan mempertemukan sel telur (oosit) matang dengan spermatozoa di luar tubuh manusia agar terjadi pembuahan atau fertilisasi. Teknik rekayasa ini dikembangkan menjadi teknik *Intra Cytoplasmic Sperm Injection Injeksi (ICSI)* yaitu teknik dalam cara menyuntikkan satu spermatozoa langsung kedalam sitoplasma oosit agar terjadi fertilisasi².

Setiap metode mempunyai persyaratan antara lain berdasarkan pada jumlah spermatozoa motil. Semakin sedikit jumlah spermatozoa motil maka penanganannya

lebih rumit dan akan semakin mahal biayanya. Pada penelitian tentang biaya untuk terapi infertilitas di Iowa tahun 1997, menyebutkan penanganan pasien dengan berbagai metode 'reproduksi bantuan' keberhasilannya tergantung pada jumlah spermatozoa. Dilaporkan bahwa pasangan infertil akan mengeluarkan biaya yang lebih besar apabila pada pria dengan jumlah spermatozoa motil yang telah dikoreksi tetap dibawah 10 juta./ml²⁻³.

Penelitian tentang peningkatan jumlah spermatozoa motil dalam kondisi in-vivo dan in-vitro dikembangkan terus, percobaan-percobaan dilakukan dengan menambahkan bahan/zat yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, harapannya bila spermatozoa motil meningkat maka pemilihan tehnik reproduksi menjadi lebih sederhana, dan biaya murah. Efek ATP terhadap maturasi dan motilitas spermatozoa telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Penambahan ATP pada epididimis tikus dapat meningkatkan maturasi dan jumlah spermatozoa motil⁴.

Dari penelitian tersebut diatas diduga bahwa ATP yang diberikan secara in-vitro dalam plasma semen manusia dapat meningkatkan motilitas spermatozoa manusia.

1.2 Rumusan masalah

Apakah pemberian ATP pada medium plasma semen secara in-vitro mempunyai efek meningkatkan kualitas motilitas spermatozoa ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa penambahan ATP pada medium plasma semen meningkatkan kualitas motilitas spermatozoa.

1.3.2 Tujuan khusus

Membuktikan bahwa ATP pada medium plasma semen mempunyai efek meningkatkan kualitas spermatozoa kategori A,B,C, dan D (menurut kriteria WHO).

1.4 Manfaat Penelitian

Dapat memberikan informasi tentang:

1. Efek dari penambahan ATP terhadap peningkatan kualitas motilitas spermatozoa.
2. Pengelolaan infertilitas pria dengan 'metode reproduksi bantuan'.

Bab II

Tinjauan Pustaka

2.1 Motilitas spermatozoa

Kesehatan spermatozoa sangat menentukan dalam proses terjadinya konsepsi. Spermatozoa yang jelek tidak akan menghasilkan konsepsi. Disamping itu juga harus dipertimbangkan faktor yang mempengaruhi baik lingkungan di luar spermatozoa dan faktor dari dalam spermatozoa sendiri.

Berdasarkan kriteria WHO⁵⁻⁶, motilitas spermatozoa dapat dibagi dalam kategori yaitu:

- a. Kategori A, di mana spermatozoa bergerak cepat dan lurus ke depan.
- b. Kategori B, di mana spermatozoa bergerak lambat atau bergerak cepat tapi tak lurus.
- c. Kategori C, di mana spermatozoa bergerak ditempat.
- d. Kategori D, di mana spermatozoa tidak bergerak.

2.1.1 Kualitas spermatozoa

Motilitas spermatozoa dianggap normal jika motilitas kategori A di tambah motilitas kategori B besarnya $\geq 50\%$ artinya dalam pengamatan 100 spermatozoa didapatkan 50 spermatozoa yang bergerak cepat lurus ke depan dan spermatozoa yang bergerak lambat ⁶.

2.1.2 Kuantitas spermatozoa.

Selain dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa, terjadinya pembuahan juga ditentukan oleh jumlah spermatozoa. Semakin banyak spermatozoa yang dihasilkan semakin besar kemungkinan terjadi konsepsi. Jumlah normal dalam setiap mililiter plasma semen terdapat ≥ 20 juta spermatozoa. Jumlah spermatozoa tersebut dianggap

dapat membuahi secara alami. Jumlah spermatozoa kurang dari 20 juta/ml disebut dengan oligozoospermia. Bila tidak mempunyai spermatozoa disebut azoospermia^{5,6}.

2.1.3 Faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa^{2,6-9}

a. Temperatur

Perubahan temperatur berpengaruh pada motilitas spermatozoa. Motilitas tidak terpengaruh pada suhu 10-35⁰C. Di bawah 10⁰C motilitas menurun dan di atas 35⁰C motilitas meningkat.

b. Tekanan osmotik

Semakin tinggi konsentrasi ion Natrium, Kalsium dan Klorida motilitas semakin menurun. Sedangkan peningkatan konsentrasi Kalium meningkatkan motilitas.

Larutan hipertonik atau hipotonik akan menurunkan motilitas spermatozoa.

c. Viskositas/ kekentalan

Semakin kental semen pergerakan spermatozoa semakin lambat.

d. pH

pH normal 7,2 – 7,8 , semakin rendah atau semakin tinggi pH akan menurunkan motilitas spermatozoa .

Jika pH lebih besar daripada 7,8, maka harus dicurigai adanya infeksi. Sebaliknya jika pH kurang daripada 7 pada siapan azoospermia perlu dipikirkan kemungkinan disgenesis vas deferens, vesika seminal atau epididimis.

e. Usia

Andropause terjadi pada pria dimulai pada usia 40-60 tahun. Andropause adalah suatu kondisi biologik tertentu yang disertai tanda, gejala dan timbulnya kumpulan keluhan yang disebabkan oleh penurunan hormon-hormon laki-laki serta biokimiawi tubuh tertentu.. Dengan demikian maka akan berpengaruh juga pada spermiogenesis dan maturasi spermatozoa.

f. Imunologi

Antibodi antisperma yaitu proses terjadinya antibodi terhadap antigen tubuhnya sendiri ini disebabkan karena traktus reproduksi pria dianggap sebagai *nonself antigen*, sehingga bila terjadi kerusakan jaringan, maka tubuh membentuk antibodi.

Antibodi antisperma dapat terjadi bila *blood-testis barrier* terjadi kebocoran, maka terjadi transfer antigen, antibodi dari lumen tubuli seminifer ke dalam sirkulasi darah dan sebaliknya, sehingga terjadi autoimun. Autoimun dapat terjadi karena beberapa hal, misalnya infeksi (prostatitis, epididimoorchitis), akibat operasi. Pengaruh aglutinasi ini berakibat penurunan motilitas.

g. Obat-Obatan

Telah dilakukan penelitian in-vitro, digoksin yang digunakan pada penderita jantung dapat berpengaruh pada penambahan motilitas spermatozoa dengan menghambat enzim $\text{Na}^+ \text{K}^+$ adenosin trifosfatase dan berperan dalam meningkatkan pompa Na^+ , sehingga terjadi peningkatan ion Na^+ yang akan meningkatkan arus masuk Ca^{2+} ke dalam sel. Ion Ca^{2+} berperan dalam membantu proses motilitas spermatozoa.

Papaverin, meningkatkan motilitas dengan menghambat enzim fosfodiesterase, berakibat meningkatnya kadar siklik adenosine monofosfat (cAMP), yang memacu aktifitas enzim fosfofruktokinase sehingga piruvat dan $\text{NADH} + \text{H}^+$ dihasilkan lebih cepat, proses ini terjadi didalam mitokondria. Proses fosforilasi oksidatif terjadi maka penambahan pasokan ATP bertambah.

2.2 Adenosin 5' trifosfat (ATP)

Adenosin 5' trifosfat (ATP) dibutuhkan sebagai generator pembangkit energi untuk kerja mekanik yaitu pergerakan spermatozoa.

Spermatozoa tidak dapat hidup lebih lama dari 1-2 jam tanpa ada glikolisis yang aktif. Metabolisme spermatozoa erat hubungannya dengan ATP, karena energi yang terkandung dalam bahan tersebut dibutuhkan untuk motilitas dan mempertahankan keseimbangan osmotik. Konsentrasi ATP pada pria fertil rata-rata $6,5 \pm 0,34 \mu\text{g}$ per100 juta spermatozoa dan dengan bertambahnya waktu terjadi penurunan spontan jumlah ATP tersebut¹⁰.

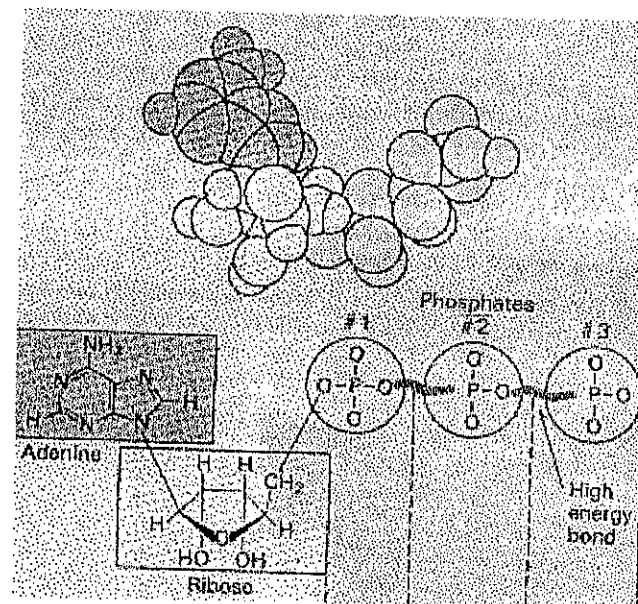
Percobaan in-vitro membuktikan bahwa 40% pemakaian heksosa berasal dari glukosa. Pada plasma semen, terdapat fruktosa 300 mg/100 ml yang menjadi substrat utama glikolisis, sedangkan glukosanya dalam jumlah sedikit (5-10 mg/100ml). Spermatozoa dalam medium in-vitro menggunakan cadangan karbohidrat yang sedikit untuk proses glikolisis pada keadaan anaerob maupun aerob, sehingga hampir semua heksosa yang diambil oleh spermatozoa diubah menjadi asam laktat, sedangkan laktat tidak di anabolisme kembali menjadi heksosa, maka perlu penambahan heksosa dari luar untuk mempertahankan motilitas spermatozoa¹¹.

Penelitian secara in-vitro, medium adenosin pada otot muskulus dan endotel tikus dapat terjadi efek vasodilatasi, medium serum albumin dengan diberikan ATP dengan menggunakan otot yang utuh pada manusia, otot tersebut dapat menghasilkan aktifitas pergerakan^{12,13}.

2.2.1 Struktur kimia ATP

ATP merupakan anggota golongan senyawa yang dinamakan nukleosida trifosfat, sebagai senyawa fosfat berenergi tinggi, terdiri dari tiga komponen yaitu

basa (adenin), gula (ribosa) dan 3 gugus fosforil yang terikat oleh ikatan ester fosfat dan terikat satu sama lain oleh ikatan fosfoanhidrida. (gambar 2.1)



Gb. 2.1 Struktur kimia ATP

(diambil dari *Fundamental of Anatomy and Physiology*, Martini)¹⁶.

Sel harus mengeluarkan energi metabolik dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP) di hidrolisis menjadi adenosin difosfat (ADP) dan fosfat anorganik¹⁴⁻¹⁶.

Reaksi hidrolisis ATP:



2.2.2 Mekanisme pembentukan energi ATP¹⁴⁻¹⁵.

Sebagian besar ATP dibentuk pada oksidasi lengkap glukosa dihasilkan dengan cara fosforilasi oksidatif didalam mitokondria.

Metabolisme pembentukan energi pada spermatozoa melalui :

- metabolisme karbohidrat (glikolisis)
- fosforilasi oksidasi (oksidasi melalui rantai pernafasan dalam mitokondria)

Kalsium dan magnesium mengaktifkan ATP-ase sebagai spermiosin dan p-aktin untuk kontraksi dan relaksasi spermatozoa.

Melalui kerja beberapa lintasan katabolik, karbohidrat dioksidasi menjadi CO_2 dan H_2O , dan energi bebas yang dilepaskan dalam proses ini digunakan untuk melakukan fosforilasi ADP menjadi ATP:

- 1) langkah pertama katabolisme monosakarida glukosa, fruktosa dan galaktosa dilakukan oleh ensim-ensim glikolisis. Lintasan glikolisis mengubah gula menjadi piruvat, suatu asam 3 karbon, yang menggunakan energi yang dikeluarkan pada proses untuk melakukan fosforilasi ADP menjadi ATP dan mereduksi NAD menjadi NADH. Piruvat dimetabolisme lebih lanjut menjadi asetil-KoA, suatu fragmen 2 karbon yang aktif, pada proses yang menghasilkan lebih banyak NADH.
- 2) Asetil-KoA yang dihasilkan oleh lintasan-lintasan ini dioksidasi menjadi CO_2 , siklus ini menghasilkan NADH, FADH_2 , dan senyawa berenergi tinggi guanosin trifosfat (GTP).
- 3) NAD dan FADH_2 yang dihasilkan pada glikolisis, β -oksidasi dan siklus asam sitrat dioksidasi kembali dengan menyumbangkan elektronnya ke rantai pentranspor elektron secara energetika dikaitkan dengan sintesis ATP mitokondria. Gabungan proses transpor elektron dan sintesis ATP dinamakan fosforilasi oksidatif^{6,10,18}.

Fosforilasi oksidatif adalah suatu proses penghasil ATP yang terjadi didalam mitokondria, ATP yang disintesis dibebaskan ke dalam matriks mitokondria. ATP dipindahkan secara aktif ke sitosol oleh suatu protein transpor, yaitu ATP/ADP translokase. Pada spermatozoa, letak mitokondria mengelilingi bagian tengah ekor spermatozoa. Mitokondria yang berbentuk spiral menyesuaikan diri dengan gerakan

memecut seperti gelombang dari ekor sperma sewaktu ekor tersebut mendorong spermatozoa. Krista mitokondria yang terkemas padat mengandung komponen fosforilasi oksidatif. Dalam lingkungan aerobik, diperkirakan 60-85% ATP untuk pergerakan yang berasal dari fosforilasi oksidatif. ATP sisanya dibentuk dari fosforilasi tingkat subserat dalam glikolisis anaerobik¹⁸⁻¹⁹.

2.2.3. Farmakologi ATP:

Cara pemberian obat antara lain: cara in-vivo: per-oral, intramuskuler, intra-vena, subkutan dan sebagainya dan cara in-vitro digunakan pada pembuatan kultur atau persemaian diluar tubuh dan seringnya digunakan pada percobaan sel. Cara in-vitro ini sangat terkontrol banyak digunakan pada penelitian, karena hubungan konsentrasi obat dan efeknya sederhana dibanding dengan pemberian secara in-vivo.

Pemberian ATP juga dapat diberikan berbagai cara seperti obat pada umumnya. Cara pemberian obat juga mempengaruhi bioavalabilitas obat. Bioavailabilitas dirumuskan sebagai bagian obat yang tidak berubah yang mencapai sirkulasi sistemik setelah pemberian melalui berbagai cara pemberian/pemasukan obat. Untuk pemberian secara oral bioavailabilitasnya 5% sampai kurang dari 100 %. Bioaviabilitas pemberian secara intramuskuler diasumsikan 75% sampai kurang dari 100%. Penelitian tentang efek pemberian ATP secara oral selama 30 hari pada tikus meningkatkan konsentrasi ATP pada usus dan serum darah sedangkan penelitian tentang efek pemberian ATP secara oral dibandingkan secara intramuskular dalam meningkatkan motilitas spermatozoa belum di temukan.

Obat yang bermanfaat bagi klinik salah satunya mempunyai cara kerja menyerupai kerja ligan endogen yang mengatur aliran ion melalui saluran membran plasma. Banyak ligan ekstraseluler bekerja dengan meningkatkan konsentrasi intraseluler

pembawa-pembawa pesan ke dua (*second messengers*) seperti *cyclic adenosin-3',5'-monophosphate*, *ion kalsium*, atau *phosphoinositide*). Pada umumnya ligan ekstraseluler menggunakan sistem sinyalasi transmembran dengan tiga komponen terpisah. Pertama ligan ekstraseluler secara khusus dideteksi melalui reseptor permukaan sel, selanjutnya reseptor tersebut, mengaktifkan protein G yang terletak di permukaan sitoplasmik membran plasma. Ke dua, protein G yang diaktifkan mengubah aktivitas elemen efektor, biasanya enzim atau saluran ion. Ke tiga, elemen ini kemudian mengubah konsentrasi pembawa pesan kedua intraseluler. Pada pemberian ATP ekstraseluler (secara in-vitro pada medium semen) telah dikemukakan beberapa penelitian antara lain disebutkan cAMP dan kalsium sangat diperlukan untuk motilitas spermatozoa^{20,21}. Penelitian lain tentang pemberian ATP ekstraseluler menstimulasi akrosomal eksositosis pada semen sapi melalui P₂ purinoceptor. Diungkapkan bahwa ATP ekstraseluler mengaktifkan *protein kinase Ca* dan menghambat *protein kinase C-specific inhibitor*, mengaktifkan P₂ purinoceptor sehingga terjadi peningkatan ion Ca²².

2.3 Struktur anatomi spermatozoa

Secara mikroskopis, struktur spermatozoa terdiri dari kepala, leher dan ekor spermatozoa.

2.3.1 Kepala

Kepala spermatozoa berbentuk oval (lonjong), terdiri dari 4 bagian yaitu akrosom, segmen ekuatorial, tudung pos-nuklear (*post nuclear cap*), berbentuk gepeng dengan ukuran panjang 3-5 µm, lebar 2-3 µm dan tebal 2 µm. Akrosom membungkus kepala lebih dari sepertiganya *mid-piece* ramping, lurus teratur berukuran 1/3 lebar kepala aksisnya, panjang 7-8 µm sedang *kauda*-nya ramping, tidak berkelok teratur dengan panjang 45 µm. Bentuk kepala yang amorfosa dengan

sehingga pada potongan frontal tampak meruncing, sedangkan pada bidang sagital tampak bulat. Spermatozoa manusia lebih banyak menunjukkan variasi pada bentuk dan ukuran kepala, ditandai khas oleh banyak vakuola serta nukleus yang menonjol dengan kondensasi kromatin yang tidak sempurna.

Secara mikroskopik, kepala spermatozoa tersusun atas bagian-bagian :

a. Permukaan membran spermatozoa

Komponen permukaan membran ini sering disebut sebagai *Sperm Coating Antigen (SCA)*.

b. Akrosom spermatozoa

Akrosom terdapat pada bagian anterior spermatozoa, dan merupakan selubung yang menutupi kira-kira 2/3 daerah kepala spermatozoa.

c. Inti spermatozoa

Inti mengandung DNA dan mungkin RNA, lipid, mukoprotein, Mg, Fe, Cu, K dan fosfat. Vakuola inti mengandung ion $K^{16,17}$.

2.3.2 Leher dan ekor

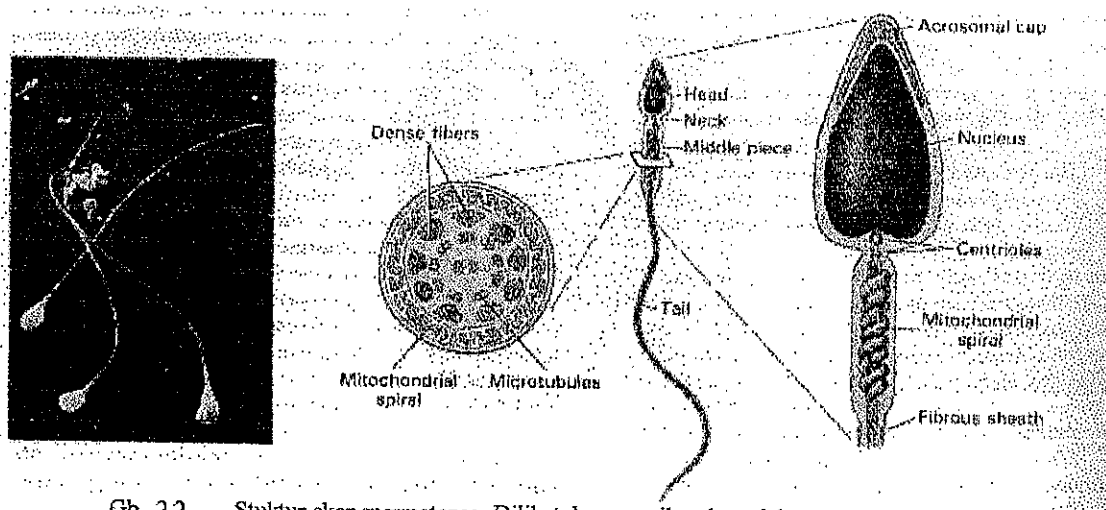
Leher dan ekor spermatozoa merupakan flagela yang digunakan untuk bergerak. Bagian ekor terdiri dari bagian '*middle piece*', '*principle piece*' dan '*end piece*'. Pada bagian '*midpiece*' terdapat mitokondria, sehingga terjadilah proses glikolisis yang menghasilkan energi berupa ATP. ATP digunakan untuk mengaktifkan flagela.

Pada bagian *mid-piece* terdapat mitokondria yang mengandung banyak lipid, K, Ca, Fe, Cu, fosfat, sulfidril, kelompok disulfid serta kolesterol^{1,11,17}.

2.4 Motor molekuler ekor spermatozoa:

Spermatozoa menggunakan pergerakan seperti cambuk dengan flagela untuk mendorong dirinya. Flagel merupakan kumpulan sel yang bukan otot, tetapi struktur ini mempunyai mekanisme kerja seperti otot. Pergerakan ditimbulkan oleh sistem

mikrotubulus yang terdiri atas sepasang tubulus sentral yang dikelilingi oleh lingkaran luar yang terdiri atas 9 mikrotubulus ganda. Mikrotubulus ganda terdiri dari subserat A dan subserat B. Sedangkan 9 pasangan mikrotubulus ini saling berhubungan dengan perantara neksin yang dihubungkan oleh struktur seperti jari-jari ke suatu selubung yang mengelilingi sepasang tubulus yang terletak di sentral. Subserat A mempunyai dua lengan. Lengan luar subserat A disebut dinein yang mempunyai aktifitas ATPase. Lengan dinein terletak sepanjang mikrotubulus luar pada setiap 2 nm. Pergerakan seperti cambuk ini akibat dari pergeseran relatif dari satu mikrotubulus ganda bagian luar terhadap mikrotubulus lain ¹⁹.



Gb. 2.2 Struktur ekor spermatozoa. Dilihat dengan mikroskop elektron
(Diambil dari buku *Fundamental of Anatomy and Physiology*, Martini) ¹⁵.

2.5 Struktur molekuler membran sel

Membran sel pada umumnya merupakan membran yang semipermeabel antara sel dan lingkungannya sehingga merupakan sawar terhadap sel-sel tertentu.

Pada umumnya terdiri atas lemak (fosfolipid, kolesterol, glikolipid) dan protein dalam jumlah seimbang. Lemak tadi tersusun dalam suatu lapis ganda dengan bagian hidrofobik berada di sebelah dalam dan bagian hidrofilik di sebelah luar. Pada

spermatozoa terdapat glikosfingolipid pada membran sel terluar, berperan untuk mengadakan interaksi dengan lingkungannya.

Protein dapat terbenam didalamnya (intrinsik) atau terikat dengan cara yang lebih longgar (ekstrinsik). Seluruh karbohidrat, baik dalam bentuk glikolipid maupun dalam bentuk glikoprotein, terdapat disisi luar membran.

Berbagai zat yang masuk kedalam sel dengan menggunakan berbagai cara. Zat-zat yang larut dalam lemak masuk ke dalam sel dengan difusi sederhana. Hal demikian tampak pula pada sejumlah kecil zat yang dapat larut dalam air. Zat-zat hidrofilik yang lain memerlukan suatu pengemban. Bila tidak diperlukan suatu energi (ATP), proses tersebut dinamai difusi dengan kemudahan. Bila diperlukan energi (ATP), maka proses tersebut dinamai transpor aktif.

Berbagai zat juga dapat memasuki sel secara pinositosis dan endositosis. Dalam kedua proses ini, sebagian dari membran terlipat dan mengelilingi bahan yang akan dimasukkan tadi dan masuk dengan cara demikian kedalam sel. Kebalikan dari peristiwa ini, eksositosis, dipakai misalnya dalam mensekresikan enzim-enzim pencernaan. Kalsium, natrium dan kalium menggunakan transpor aktif yang dinamai pompa^{17-18,24-26}

2.6 Plasma semen

Semen merupakan sekret yang terdiri atas spermatozoa dan plasma semen. Plasma semen berfungsi sebagai media untuk transportasi spermatozoa dari traktus reproduksi pria ke traktus reproduksi wanita, sebagai media larutan penyangga yang berisi makanan untuk spermatozoa. Tekanan osmotik plasma semen penting, karena kadar garam yang terlampau tinggi atau rendah dapat mematikan spermatozoa. Komponen kimia yang terkandung dalam plasma semen adalah :

lisosim, α -amilase, plasmogen aktivator dan suatu proteinase semen (seminin adalah enzim yang menyerupai kemotripsin), karbohidrat, asam amino, protein, lipid, hormon steroid dan gonadotropin, ion, enzim dan prostaglandin. Plasma semen ini dibentuk secara bertahap, tahap I dibentuk oleh sekret kelenjar Cowper dan Litre /sekret glandula bulbo-uretralis (sekitar 0,1 - 0,2 ml), tahap II oleh sekret kelenjar prostat (sekitar 0,5 ml), sedangkan tahap III oleh sekret vesikula seminalis (rata-rata 2,4-2,9 ml), pH 6,5 dan ada asam fosfatase, kalsium, seng, glukoronidase, seminin dan inositol lisosim, amilase. Sekret vesikula seminalis 2,5 ml, bersifat alkalis, mengandung gula reduksi, fruktosa, ion K^+ yang tinggi, fosforilkholin, protein dan juga prostaglandin.

Pada manusia volume ejakulat normal rata-rata 3-3,5 ml (kisarannya 1-6 ml). Spermatozoa yang terkandung hanya 5% dari volume total, dengan kisaran kadar spermatozoa 50-150 juta/ml atau jumlah totalnya berkisar antara 100-300 juta¹¹.

2.8 Kerja kinetik ekor spermatozoa:

Pergerakan spermatozoa sangat diperlukan untuk mencapai pembuahan membentuk individu baru, yaitu pergerakan untuk perjalanan naik dalam traktus reproduksi wanita dan melakukan fertilisasi oosit. Proses pergerakan tersebut sangat memerlukan energi yaitu ATP.

ATP dihasilkan melalui proses metabolisme. Pada ekor spermatozoa, bagian dasarnya terdapat struktur serupa turbin yang memberikan gerakan berputar.

ATP yang terikat menghasilkan dinein-ADP-Pi, yang terikat kembali ke subserat B. Penggabungan dinein dengan subserat B menyebabkan pembebasan Pi. Memungkinkan hentakkan yang menimbulkan kekuatan terjadi dalam tahap ini.

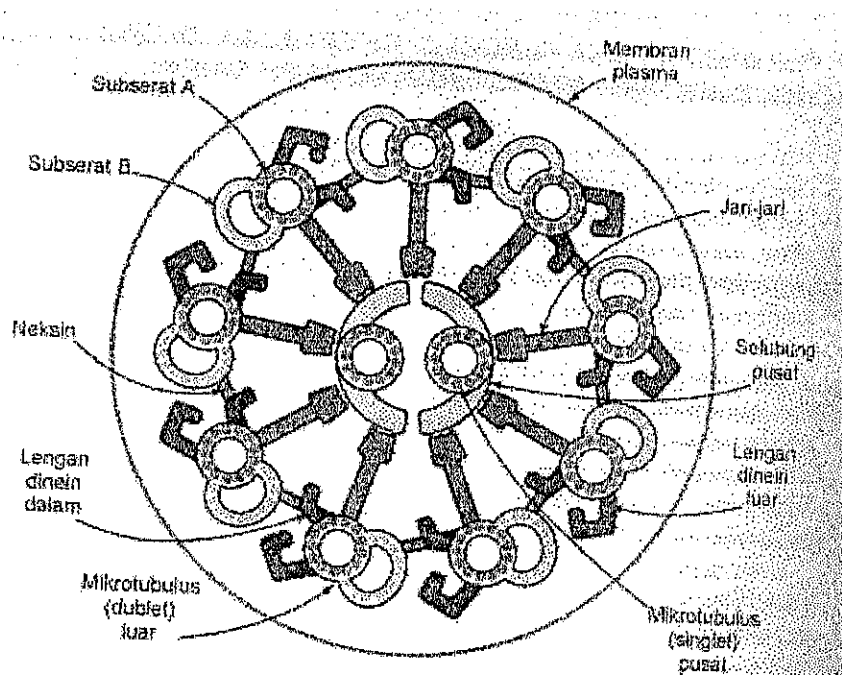
Tubul pusat merupakan alat pacu bagi aktifitas pergerakan. Gerakan yang khas disebabkan oleh proses meluncurnya filamen tubular terhadap sesamanya yang tergantung dari ATP. Ujung-ujung tubulus terfiksasi pada dasar flagela dan pergerakan tubulus dibatasi oleh neksin, maka pergeseran diubah menjadi gerakan membengkok. Kekuatan untuk menggeser ditimbulkan oleh lengan dinein yang melekat pada dan lepas dari mikrotubulus yang berdekatan. Energi yang digunakan untuk pergerakan disediakan dari ATP. Bila kekurangan energi, lengan dinein secara permanen mengikat mikrotubulus yang berdekatan. Ekor spermatozoa merupakan seberkas serat yang disebut aksonema, dilapisi suatu membran yang merupakan perluasan membran sitoplasma. Serat dalam aksonema ini adalah mikrotubulus.

Ekor spermatozoa merupakan motor molekul terdiri dari dinein. Dinein bergerak di sepanjang mikrotubulin. Pergerakan pada ekor spermatozoa dikelilingi oleh struktur perpanjangan dari membran sel. Gerakan bergelombang disebabkan oleh hidrolisis ATP. Gerakan ini disebabkan oleh meluncurnya atau melilitnya pasangan mikrotubular, yang ditunjang oleh ATP. Pasangan mikrotubular di sebelah luar mengandung 'tangan' pada jarak/interval tertentu. Tangan luar ini terdiri dari molekul dinein, suatu protein besar yang memiliki aktifitas ATPase. Hidrolisis ATP oleh dinein memberikan energi bagi gerakan mekanik meluncur atau melilit pada mikrotubul. Pengikatan ATP ke dinein membebaskan protein ini dari subserat B. Hidrolisis dari dari molekul dinein, suatu protein besar yang memiliki aktivitas ATPase. Hidrolisis ATP oleh dinein memberikan energi bagi gerakan mekanik meluncur atau melilit pada mikrotubula.

Pengikatan ATP ke dinein membebaskan protein ini dari subserat B. Hidrolisis dari ATP yang terikat menghasilkan dinein-ADP-Pi, yang terikat kembali ke subserat B. Penggabungan dinein dengan subserat B menyebabkan pembebasan Pi, seperti halnya

pengikatan S1 ke aktin. Memungkinkan hentakkan yang menimbulkan kekuatan terjadi dalam tahap ini.

Tubul pusat merupakan alat pacu bagi aktifitas pergerakan. Gerakan yang khas disebabkan oleh proses meluncurnya filamen tubular terhadap sesamanya yang tergantung dari ATP. Karena pada ujung-ujung tubulus terfiksasi pada dasar flagela dan karena pergerakan tubulus dibatasi oleh neksin, pergeseran diubah menjadi gerakan membengkok. Kekuatan untuk menggeser ditimbulkan oleh lengan dinein yang melekat pada dan lepas dari mikrotubulus yang berdekatan. Energi yang digunakan untuk pergerakan disediakan dari ATP. Bila kekurangan energi, lengan dinein secara permanen mengikat mikrotubulus yang berdekatan^{24,26}.



Gb.2.2 Bagan dari bagian mikrotubulus ekor spermatozoa

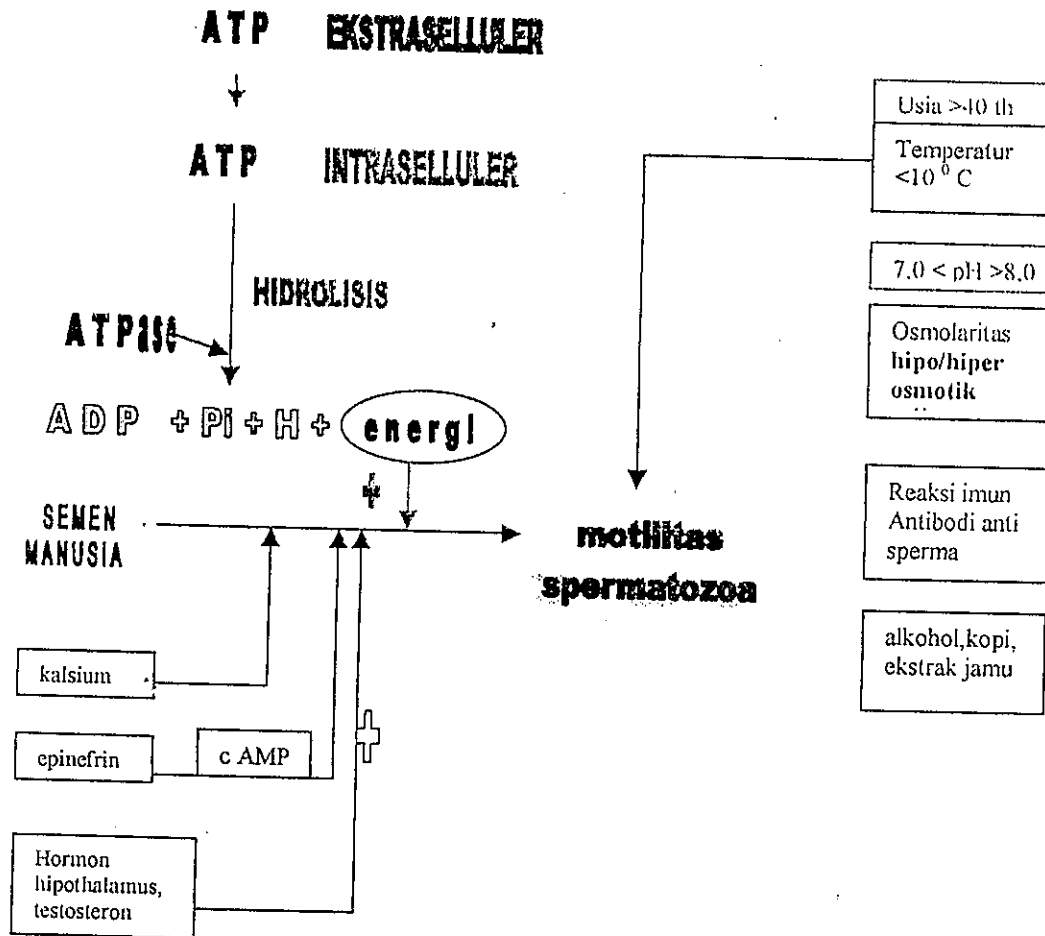
(diambil dari Biokimia vol 1. ,Stryer)²⁶

Dari uraian diatas, ATP sangat dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa. Sedangkan proses pembentukan ATP sangatlah panjang, yaitu melalui proses glikolisis dan fosforilasi oksidatif dengan organ yang terkait adalah mitokondria.

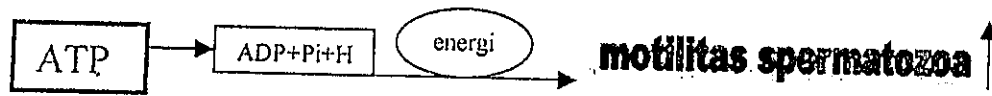
BAB III

KERANGKA TEORI, KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Teori



3.2. Kerangka Konseptual



3.3 Hipotesis

Pemberian ATP pada medium in-vitro plasma semen mempunyai efek meningkatkan kualitas motilitas spermatozoa (dinilai menurut kriteria WHO: kategori A, B, C, dan D).

3.4. Keterbatasan Pemeriksaan

Dalam keterbatasan alat dan reagen pemeriksaan, maka penelitian ini tidak memeriksa ADP plasma spermatozoa. Kendala pemeriksaan adenosin adalah pelabelan adenosin dengan radioaktif, serta alat pendeteksi radioaktif belum tersedia.

BAB IV

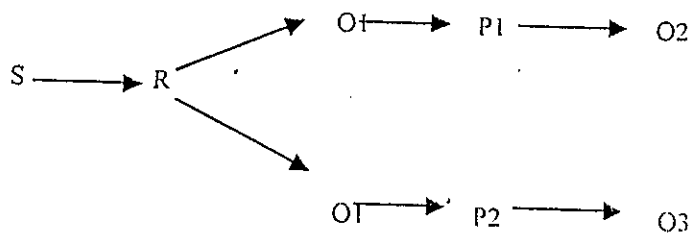
Materi dan Metode penelitian

4.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian : *experimental*.

Rancangan penelitian: *Randomized controle pre and posttest design*

Rancangan proses penelitian:



S = plasma semen

R = randomisasi

O1 = pemeriksaan awal.

P1 = Kelompok plasma semen tanpa perlakuan.

O2 = Pemeriksaan akhir pada kelompok tanpa perlakuan.

P2 = Kelompok plasma semen dengan perlakuan (penambahan ATP 7 µg/ml).

O3 = Pemeriksaan akhir pada kelompok dengan perlakuan.

4.2. Populasi, sampel dan besarnya sampel

4.2.1. Populasi penelitian:

Populasi target : populasi spermatozoa pria normal.

Populasi terjangkau: spermatozoa dari pria dewasa.

b. Sampel:

Sampel diambil dari pria dewasa dan memenuhi kriteria inklusi /eksklusi

Kriteria inklusi:

1. Pria, usia 30-45 tahun
2. Normospermia yaitu jumlah spermatozoa > 20 juta /ml, volume semen 2-5 ml, pH= 7,2 -8 , cacah sel lekosit < 1 juta/ml.

Kriteri eksklusi:

1. peminum alkohol, kopi.
2. konsumsi ekstrak jamu kuat lelaki.

c. Besarnya sampel

Rumus untuk menghitung besarnya sampel dari 2 kelompok independent²³⁻²⁵.

Bila : $n_1 = n_2$

$$n = \frac{2 \left[\frac{\delta (Z_{\alpha} + z_{\beta})}{\Delta} \right]^2}{}$$

n = besar sampel

δ = SD(standart deviasi) ≈ 7

α = tingkat kemaknaan (0,05)

$z_{\alpha} = 1.96$

β = power

$z_{\beta} = 0.842$

Δ =Perkiraan peningkatan bermakna sekitar 20 %

Perhitungan:

$$n = \frac{2 \left[\frac{7 (1.96 + 0.842)}{5} \right]^2}{}$$

n = 22

perkiraan sampel untuk penelitian ini 22 probandus²⁷⁻²⁹.

4.3. Lokasi dan Tempat Penelitian

Pasien didapat dari Laboratorium Andrologi Fakultas Kedokteran UNDIP, Bagian Obstetri dan Ginekologi RS.dr.Kariadi, Klinik Infertilitas RS Telogorejo di Semarang. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium RS. Telogorejo, Semarang.

4.4. Variabel Penelitian:

4.4.1. Variabel bebas:

ATP adalah *adenosine triphosphate disodium* 20 mg/ml dalam pelarut air.

4.4.2. Variabel terpengaruh:

Motilitas spermatozoa dinyatakan dengan persentase terhadap 100 jumlah spermatozoa (skala ratio/numerik).

4.4.3. Definisi operasional variabel:

a) ATP , pemberian penambahan ATP sebesar $7\mu\text{g/ml}$.

b) Motilitas spermatozoa :

Kategori A, di mana spermatozoa bergerak cepat dan lurus ke depan.

Kategori B, di mana spermatozoa bergerak lambat atau bergerak cepat tapi tak lurus.

Kategori C, di mana spermatozoa bergerak ditempat.

Kategori D, di mana spermatozoa tidak bergerak.

4.5. Bahan dan alat:

4.5.1. Bahan :

a) ATP injeksi, Kyowa

Isi: *adenosine triphosphate disodium* 20 mg/ml dalam pelarut air.

b) Kertas pH (Boeringer Mainhem)

c) Aquadest

4.5.2. Alat:

- a) Bilik Makler.
- b) gelas ukur 10 cc.
- c) stik mengaduk dari gelas.
- d) Mikropipet 5 μ l, 150 μ l (Clinipette).
- e) mikroskop cahaya (Cambridge instrument).
- f) mikroskop inverted.

4.6. Strategi Penelitian

4.6.1. Pengumpulan siapan

1. penjelasan tentang cara pengumpulan dan membawa ke tempat pemeriksaan.
2. siapan diambil setelah abstinensia 3 hari.
3. Anamnesis penderita yang meliputi identitas, riwayat perkawinan, jumlah keluarga, riwayat pekerjaan (mencakup tempat dan lama bekerja), kebiasaan peminum alkohol, kopi, konsumsi penambah tenaga.
4. cara pengambilan semen dengan masturbasi dalam sebuah kamar yang tenang dekat laboratorium. Penampungan pada botol yang berlabel, steril, berwarna coklat, mulut botol lebar.
5. siapan harus dilindungi terhadap suhu (suhu kamar laboratorium diantara 30-35°C)

4.6.2. Pengolahan siapan

4.6.2.1. Pemeriksaan makroskopi

a) Penampilan

Siapan semen pertama -tama dinilai dengan mengamati penampilannya pada suhu kamar.

Semen normal mungkin mengandung butir-butir seperti agar-agar (jelly) yang tidak mencair. Siapan harus diperiksa segera setelah pencairan atau dalam waktu satu jam setelah ejakulasi. Sebelum diperiksa siapan harus diaduk dengan baik dalam botol penampungannya.

b) volume

volume siapan harus diukur dengan suatu gelas ukur atau dengan cara menyedot seluruh siapan ke dalam suatu semprit atau pipet ukur.

c) Konsistensi.

Dengan cara memasukkan tangkai kaca ke dalam siapan dan kemudian mengamati benang yang terbentuk pada saat batang tersebut dikeluarkan.

Panjang benang tidak boleh lebih daripada 2 cm.

d) pH

Setetes semen disebarkan secara merata diatas kertas pH. Setelah 30 detik warna daerah yang dibasahi akan merata dan kemudian dibandingkan dengan kertas kalibrasi untuk dibaca pH-nya dan harus diukur dalam waktu satu jam setelah ejakulasi dan harus berada dalam kisaran 7,2-7,8.

4.6.2.2. Pemeriksaan mikroskopis:

a) Cara menghitung jumlah spermatozoa

Semen yang sudah likuifaksi diaduk hingga homogen, kemudian disedot dengan mikropipet. Akhirnya semen diteteskan pada bilik *Makler* dan dilihat dibawah mikroskop cahaya. Jumlah spermatozoa/ml adalah jumlah spermatozoa dalam 10 kotak x 1 juta.

b) Cara menghitung persentase motilitas spermatozoa

Letakkan satu tetes semen pada bilik *makler* kemudian ditutup, tunggu sebentar, baru kemudian diamati 100 spermatozoa dan dihitung persentase motilitas pada masing-masing kategori.

4.6.2.3. Dasar penambahan ATP sebesar 7 μ g/ml:

a) Konsentrasi ATP plasma semen pada pria fertil rata-rata $6,5 \pm 0,34 \mu\text{g}$ per 100 juta spermatozoa.

- b) Pemeriksaan pendahulu untuk mendapatkan motilitas yang baik yaitu dengan perbandingan 1 bagian ATP : 30 bagian plasma semen (setara penambahan ATP sebesar $7\mu\text{g/ml}$).

4.6.3. Alur Penelitian

Plasma semen di tampung dalam gelas/botol hitam steril dalam suhu kamar $30-35^{\circ}\text{C}$. Pemeriksaan menggunakan alat: mikroskop terbalik dan bilik *makler*.

Plasma semen dibagi 2 kelompok :

Kelompok 1 : $150\ \mu\text{l}$ plasma semen dilakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa pada 0 menit, kemudian tanpa penambahan ATP, setelah 15 menit dilakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa.

Kelompok 2 : $150\ \mu\text{l}$ plasma semen dilakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa pada 0 menit, kemudian ditambahkan $5\ \mu\text{l}$ ATP (setara $7\mu\text{g/ml}$ ATP) setelah 15 menit dilakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa.

4.7. Analisis Data

1. Pembersihan data, pengkodean, pemasukan data, dan tabulasi
2. Analisis deskriptif.
3. Uji hipotesis: Uji t-tes atau Mann Whitney.

BAB V

HASIL PENELITIAN

Berhasil dikumpulkan 23 responden untuk kelompok yang diberi ATP dan 23 responden yang tidak diberi ATP. Jumlah keseluruhan 46 responden.

Nilai statistik deskriptif diringkaskan pada tabel 1.

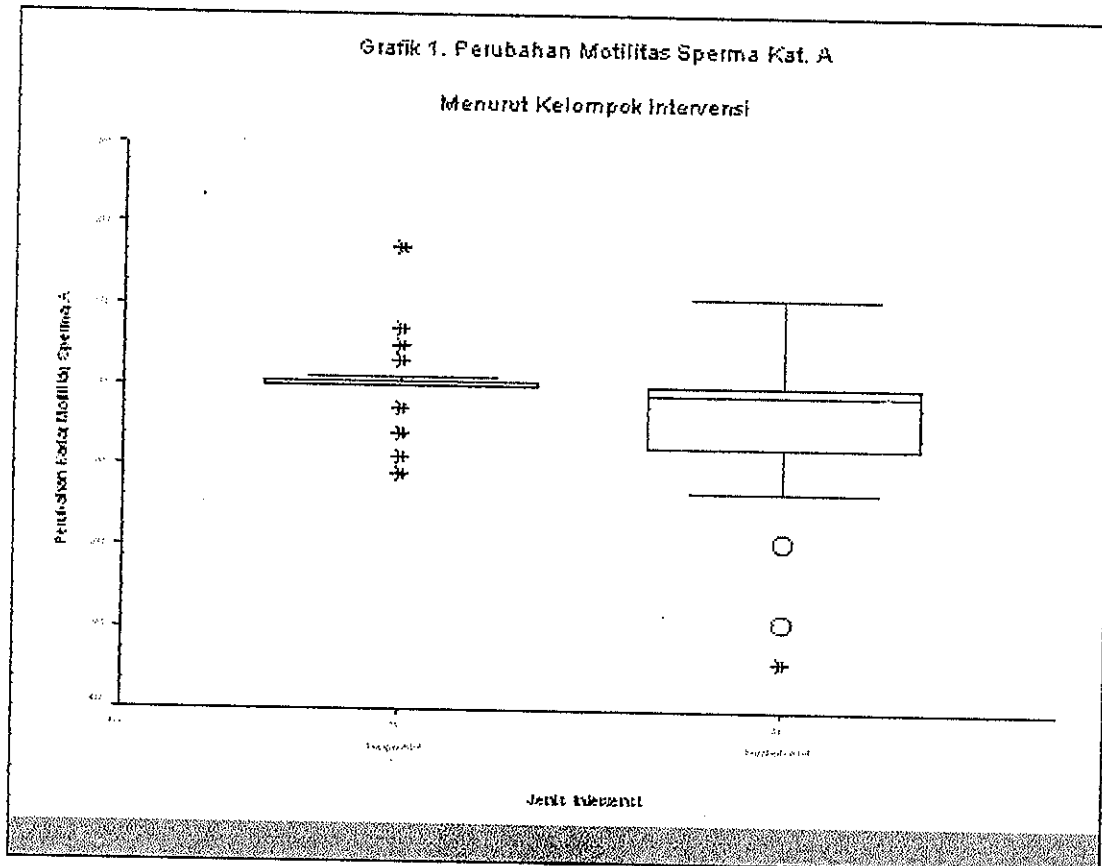
Dapat dibandingkan nilai-nilai mean dan median yang ternyata berbeda sekali pada kategori A, B, C, dan D dari motilitas spermatozoa, baik pada kelompok yang diberi ATP maupun yang tidak diberi ATP.

Tabel 1. Motilitas Spermatozoa (A, B, C dan D) menurut Kelompok Intervensi

Variabel kategori motilitas	Mean pada saat 0 menit		Mean pada saat 15 menit	
	Tanpa penambahan ATP	Dengan penambahan ATP	tanpa penambahan ATP	Dengan penambahan ATP
A	4,6	5,1	4,3	10,7
B	40,1	29,6	24,4	32,4
C	6,8	6,9	9,9	6,8
D	57,7	58,4	61,4	50,1

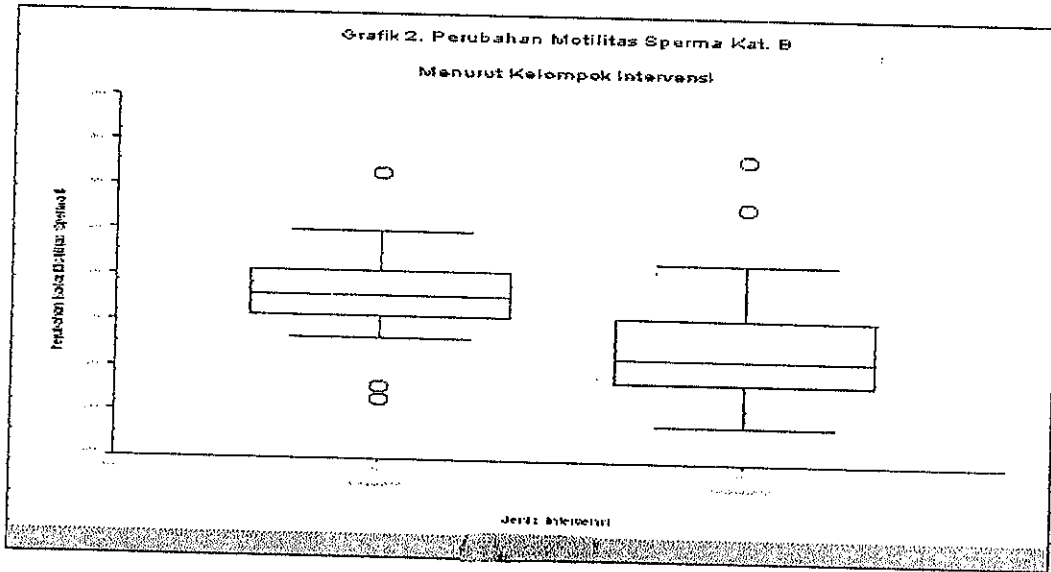
Untuk memperjelas distribusi dan perubahan motilitas spermatozoa (A, B, C, dan D) pada awal dan 15 menit setelah intervensi akan disajikan grafik *box-plot* menurut kelompok intervensi sebagai berikut:

Dari grafik 1 di atas terlihat median perubahan motilitas spermatozoa kategori A pada kelompok intervensi sedikit lebih tinggi daripada kelompok non-intervensi.



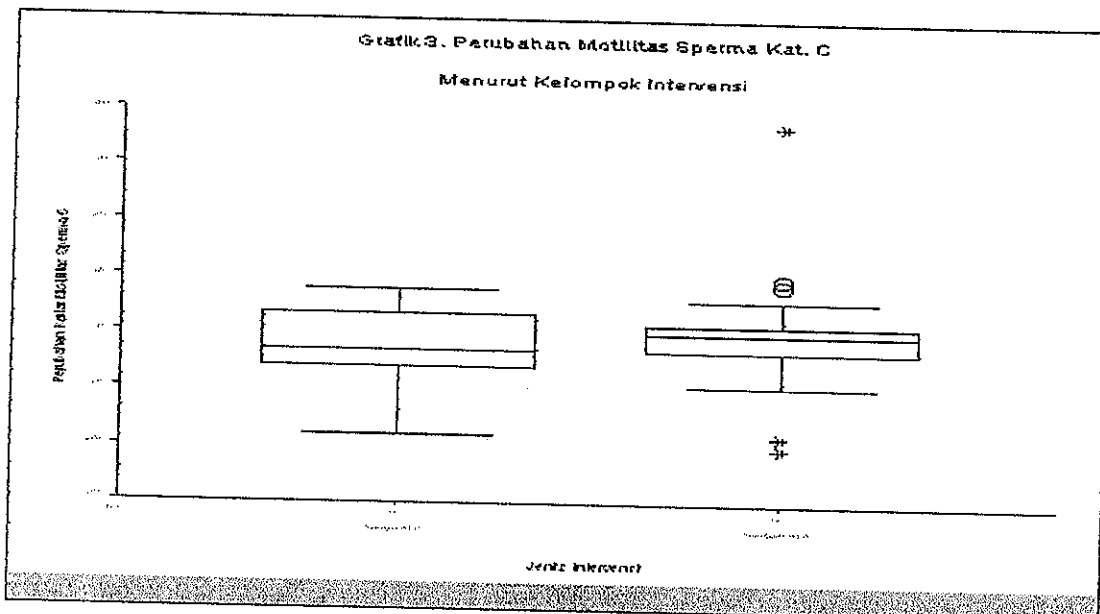
Grafik 1. Distribusi motilitas spermatozoa kategori A menurut kelompok intervensi

Pada grafik 2 terlihat median perubahan motilitas spermatozoa kategori B pada kelompok intervensi lebih tinggi daripada kelompok non-intervensi. Perbandingan tersebut sangat nyata terlihat.



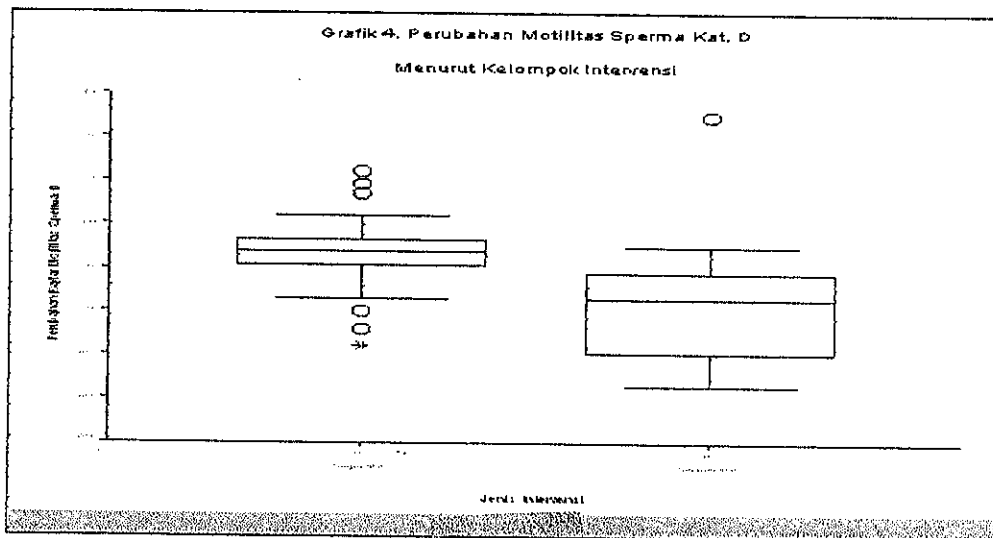
Grafik 2. Distribusi motilitas spermatozoa kategori B menurut kelompok intervensi

Pada grafik 3 terlihat bahwa median perubahan motilitas spermatozoa kategori C pada kelompok intervensi lebih rendah daripada kelompok non-intervensi



Grafik 3. Distribusi motilitas spermatozoa kategori C menurut kelompok intervensi

Pada grafik 4 terlihat median perubahan motilitas spermatozoa kategori D pada kelompok intervensi lebih tinggi daripada kelompok non-intervensi.



Grafik 4. Distribusi motilitas spermatozoa kategori D menurut kelompok intervensi

PENGARUH PEMBERIAN ATP

Untuk memilih jenis uji hipotesis yang tepat, maka perlu dilakukan uji normalitas distribusi variabel dependent yang akan dinilai (A, B, C atau D). Uji hipotesis yang dilakukan merupakan uji beda terhadap perubahan motilitas (dapat kenaikan atau penurunan nilai) dari awal dan akhir.

Hasilnya diringkaskan pada tabel 2 sebagai berikut:

Bahwa besarnya perubahan motilitas sebelum dan sesudah intervensi pada kategori A, B, C, dan D sangat bervariasi menurut jenis intervensinya. Sedangkan uji normalitas menunjukkan Nilai-nilai Perubahan motilitas kategori B dan C berbentuk normal, sedangkan A dan D tidak normal.

Tabel 2. Uji Normalitas Perubahan motilitas kategori A, B, C dan D

Variabel kategori motilitas	Nilai Kolmogorov- Smitnov	Nilai-p	Distribusi
A	1,708	0,006	Tidak normal
B	0,536	0,936	normal
C	0,834	0,490	normal
D	2,542	0,0001	normal

5.1. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa Kategori A .

Dinilai dengan menguji hipotesis perubahan motilitas kategori A sebelum dan sesudah intervensi menurut jenis intervensinya. Hasilnya diringkaskan pada tabel 3 sebagai berikut: Dapat disimpulkan pemberian ATP mempengaruhi perubahan motilitas kategori A ($p = 0,008$).

Tabel 3. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Perubahan Motilitas Kategori A

Variabel kategori motilitas	Nilai Z	Nilai p
A	2,668	0,008

Peningkatan motilitas spermatozoa pada kelompok kategori A dengan penambahan ATP lebih baik dibandingkan pada kelompok kategori A tanpa penambahan ATP.

Dari Tabel 1 dapat dihitung mean perubahan kategori motilitas A pada kelompok tanpa ATP tidak mengalami perubahan, sedangkan pada kelompok yang diberi penambahan ATP mengalami kenaikan sebesar 148% (dari 4,3 ke 10,7).

5.2. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Motilitas Spermatozoa Kategori B, C, dan D.

Dinilai dengan menguji hipotesis perubahan motilitas kategori B, C, dan D sebelum dan sesudah intervensi menurut kelompok intervensinya. Hasilnya diringkaskan pada Tabel 4 sebagai berikut:

Dapat disimpulkan ada perbedaan pengaruh pemberian ATP pada perubahan motilitas kategori B ($p = 0,011$) dan kategori D ($p = 0,002$). Sedangkan pemberian ATP ternyata tidak berpengaruh pada perubahan motilitas kategori C ($p = 0,25$).

Tabel 4. Pengaruh Pemberian ATP terhadap Perubahan Motilitas Kategori B, C, dan D

Variabel kategori motilitas	Nilai t	Df	Nilai p
B	2,66	44	0,011
C	1,18	44	0,256
D	3,27	44	0,002

Peningkatan motilitas spermatozoa pada kelompok kategori B dengan penambahan ATP lebih baik dibandingkan pada kelompok kategori B tanpa penambahan ATP. Sedangkan pada kelompok kategori C dengan penambahan ATP tidak terjadi peningkatan motilitas spermatozoa.

Kembali pada tabel 1 pada kelompok yang diberi ATP meannya mengalami kenaikan sebesar 32% (dari 24,4 ke 32,4). Pada kelompok C yang diberi ATP meannya mengalami penurunan sebesar 31% (dari 9,9 ke 6,8). Sedangkan pada kelompok kategori D dengan penambahan ATP terjadi penurunan motilitas spermatozoa dibandingkan pada kelompok kategori D tanpa penambahan ATP.

Mean perubahan kategori motilitas D pada kelompok dengan ATP mengalami penurunan sebesar 18 % (dari 61,4 ke 50,0).

5.3. Kelemahan Penelitian

Meskipun jumlah sampel minimal ($n = 22$) terpenuhi, dan berhasil diperiksa sebanyak 23 sampel perkelompok, ternyata dalam analisis data (grafik box-plot pada grafik 1 sampai 4 terlihat distribusinya sangat heterogen (grafik1) sedangkan pada grafik 2,3, dan 4 juga cukup heterogen, sehingga akibatnya perbandingan mean dan median sangat kontras. Namun karena dukungan teoritis pengaruh ATP cukup kuat, maka berdasar hasil perhitungan statistik kesimpulan diasumsikan cukup valid.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh pemberian ATP terhadap spermatozoa kategori A.

Peningkatan motilitas spermatozoa pada kelompok kategori A dengan penambahan ATP lebih baik dibanding kelompok kategori A tanpa penambahan ATP.

ATP sebagai generator dalam menyediakan energi, sehingga pada penelitian ini ternyata ATP memang terbukti bermakna dalam menambah jumlah spermatozoa yang motil pada kategori A.

Penelitian Luria dkk, pemberian ATP ekstrasel dapat menstimulasi akrosom eksositosis dengan mempengaruhi *receptor-mediated release of second messenger* dan meningkatkan ion kalsium²².

Penelitian Romac dkk, pemberian adenosin dapat meningkatkan motilitas spermatozoa dan kinetik dari dinein ATPase pada normo dan astenospermia melalui A₂ receptor³⁰.

6.2 Pengaruh pemberian ATP terhadap spermatozoa kategori B.

Peningkatan motilitas spermatozoa pada kelompok kategori B dengan penambahan ATP bermakna ($p=0,011$).

Kelompok dengan penambahan ATP akan mengalami kenaikan motilitas kategori B rata-rata sebesar 32% lebih tinggi dibanding kelompok tanpa ATP.

6.3. Pengaruh pemberian ATP terhadap spermatozoa kategori C.

Kelompok kategori C dengan penambahan ATP tidak bermakna terhadap peningkatan motilitas spermatozoa. Kelompok kategori C dengan penambahan ATP terjadi penurunan motilitas sebesar 31% .

Secara klinis, kelompok ini ada spermatozoa yang bereaksi terhadap ATP dan berpindah ke-kategori B atau bertahan pada kategori C, sedangkan yang mati akan bermigrasi ke kategori D.

6.4 Pengaruh pemberian ATP terhadap spermatozoa kategori D

Pada kelompok kategori D dengan penambahan ATP terjadi penurunan 18 % dibanding kelompok kategori D tanpa penambahan ATP.

Kriteria D (WHO) yaitu kelompok dimana spermatozoa tidak bergerak/mati.

Secara klinis, penambahan ATP tidak berpengaruh pada kelompok motilitas kategori D, di mana terjadi peningkatan jumlah spermatozoa yang mati/tidak bergerak. Ini disebabkan karena telah terjadi kerusakan sel dimana dinein tidak dapat mengikat ATP kembali.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian, analisis hasil penelitian, dan pembahasannya, dapat diambil simpulan klinis sebagai berikut:

Pemberian cairan ATP secara in-vitro pada plasma semen mempunyai efek meningkatkan kualitas motilitas spermatozoa.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian pembahasan, dan simpulannya, maka perlu melakukan penelitian lebih lanjut tentang:

1. Pemeriksaan kadar ATP pada plasma semen tanpa penambahan ATP dibandingkan dengan plasma semen dengan penambahan ATP.
2. Pemberian ATP pada sampel pasien normospermia dibandingkan dengan pasien oligospermia.
3. Keberhasilan inseminasi pasien infertilitas dengan menggunakan penambahan ATP secara in-vitro dibandingkan dengan yang tidak diberi ATP?

DAFTAR PUSTAKA:

1. Mitchell JA, Nelson L, Hafez ESE. Motility of spermatozoa. In: Human Semen and Fertility regulation in men. Hafez E.S.E. Saint Louis: The C.V Mosby Company. 1976:83-99.
2. Ikawati Y, Kasdu D. Bayi Tabung Harapan baru. Jakarta. MAPIPTEK. 2000
3. Voorhis BJV, Sarks ART, Allen BD, Stovall DW, Syrop CH, Chapler FK. Cost-effectiveness of infertility treatment. *Fertile Sterile*. 1997; 67: 830-6.
4. Suharso P, Herman R, Soeradi O, Tadjudin MK. Dinein ATPase dan $Na^+ K^+$ ATPase dalam maturasi spermatozoa tikus. Indonesia Society of Andrology. Bali. 1982.
5. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm Cervical Mucus Interaction. New York: Cambridge University Press, 1992. (Sitter).
6. Soehadi K, Arsyad KM. Analisa Sperma. Surabaya. Airlangga University Press. 1982.
7. Soehadi K, Arsyad KM. Segi Immunologis infertilitas pasangan suami istri dan metode-metode pemeriksaannya. Surabaya. Unair, 1982
8. Susilo W. Andropause atau P.A.D.A.M Semarang. Badan Penerbit UNDIP. 1998.
9. Moeloek N. Peningkatan motilitas sperma dengan penambahan papaverin HCL setelah pembekuan semen manusia. Jakarta. *Majalah obstetri-ginekologi Indonesia*. 1996 .20; 3:177-9.
10. Peterson RN, Freund M. Metabolism of human spermatozoa. In: Human Semen and Fertility Regulation in men. Hafez ESE (Ed). Saint Louis: The C.V Mosby Company. 1976; p176-185.

11. Polakoski KL, Syner FN, Zaneveld LJD. Biochemistry of human seminal plasma. In: Human Semen and fertility regulation in men. Hafez ESE (Ed). Saint Louis: The C.V Mosby Company. 1976:133-43.
12. Ponte CG, Oliveira CF, Kurtz GS. Bovine serum Albumin potentiates caffeine or ATP induced tension in human skinned skeletal muscle fiber. Braz J Med Biol RES. 1997, 30 (5): 6750-78.
13. Hellsten Y, Frandsen. Adenosine Formation in contracting primary rat skeletal muscle cells and endothelial cell in cultur. Journal of Physiology. 1997, 504.3, p.695-704. <http://physiology.cup.cam.ac.uk/jphysiol/1997/504p3/6662/6662>.
14. Lehninger A.L, Thenawidjaya M. Principles of Biochemistry. Worth Publishers.1982
15. Harper HA, Rodwell VW, Mayer PA. Biokimia (Review of Chemistry). Alih bahasa: Martin Muliawan Edisi 17. Jakarta EGC.
16. Martini F , Ober WC, Garrison CW, Welch K. Fundamentals of Anatomy and Physiology. New Jersey. Prectice-Hall.1992.
17. Pedersen H, Fawcett DW. Functional anatomy of the human spermatozoon. In: Hafez ESE. (Ed). Human semen and fertility regulation in men. Saint Louis: The C.V Mosby Company,1976:65-75.
18. Zaneveld LJD, Polakoski KL. Biochemistry of Human Spermatozoa. In: Human Semen and fertility regulation in men. Hafez ESE (Ed). Saint Louis. The C.V Mosby Company. 1976:167 -75.
19. Marks DB, Marks AD, Smith CM. Biokimia Kedokteran Dasar Sebuah pendekatan klinis. Alih bahasa: Pendit BU. Jakarta. EGC. 1996.

20. Bourne HR, Zastrow M. Drug Receptors & Pharmacodynamic. In: Basic & Clinical Pharmacology. Katzung BG (Ed). USA. Lange Medical Books.2001: 9-33.
21. Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biology of Reproduction*. 1983. 28. p:75-104.
22. Luria A, Rubinstein S, Lax Y, Breitbart H. Extracellular Adenosine triphosphat stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P₂ purinoceptor. *Biology of Reproduction*. 2002. 66.p:429-37.
23. Dharrna A (alih bahasa). Pergerakan Biologi. In: *Biochemistry A synopsis*. Colby SD. Jakarta. EGC.1992;247-62.
24. Stryer L. Biokimia vol 1 (Biochemistry). Alih bahasa: Soegiarto RR. Dalam: *Struktur dan dinamika membran*. Jakarta. EGC.1999:263.
25. Johnson KE. Histologi dan biologi sel. Alih bahasa. Gunawijaya FA. Dalam: *Membran plasma dan permukaan sel*. Jakarta Binarupa Aksara.1994.
26. Stryer. L . Biokimia vol 1 (Biochemistry). Alih bahasa: Soegiarto RR. Dalam: *Fosforilasi oksidatif*. Jakarta. EGC.1999:263.
27. Hulley SB, Cummings SR. Estimating Sample Size and Power. In: *Designing Clinical Research. An Epidemiologic Approach*. USA. Williams & Wilkins.1988.
28. Noerpramana NP. Penentuan besarnya sampel penelitian. *Majalah Kedokteran Indonesia* 1991; 4: 271-281.
29. Sastroasmoro S, Ismael S. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Jakarta. IKA UI.p187-213

30. Romac P, Grubisic TZ, Culic, Cvitkovic, Flogel M. Sperm motility and kinetics of dynein ATPase in astheno-and normozozpermic samples after stimulation with adenosine and its analogues. *Human Reproduction*. 1994; 9: p1474-8.