

Motilitas spermatozoa manusia setelah simpan beku dengan medium
TES-Tris yolk citrat (TES-TYC)

Oleh :
Muhammad Anwar Djaelani
Agung Janika Sitaswi

Abstract :

The aim of this research was to evaluate the effect of semen cryopreservation using TES-Tris yolk citrat (TES-TYC) medium on motility of the sperm. Semen fulfilling inclusion criteria with WHO 1999 criteria. The sperm motility was counted as initial data. The semen was then mixed with TES-TYC medium and cryopreserved in liquid nitrogen. After one month the semen was thawed and recount its sperm motility. Data obtained showed that the motility of post freezing sperm cryopreserved was lower compared to the motility of pre freezing sperm. It could be concluded that cryopreservation caused decrease integrity and death of sperm during cryopreservation, that showed the motility of post freezing sperm cryopreserved was lower compared to the motility of pre freezing sperm.

Key word :

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh simpan beku semen menggunakan medium TES-Tris Yolk Sitrat (TES-TYC) terhadap motilitas sperma. Kriteria inklusi semen sesuai dengan criteria WHO 1999. Motilitas sperma dihitung sebagai data awal. Kemudian semen dicampur dengan medium TES-TYC dan disimpan beku dalam nitrogen cair. Setelah sebulan semen diambil dan sperma dihitung kembali motilitasnya. Data menunjukkan bahwa motilitas sperma setelah simpan beku lebih rendah dibanding motilitas sperma sebelum simpan beku. Hal ini dapat disimpulkan bahwa selama proses pembekuan simpan beku menyebabkan kerusakan dan kematian sperma, yang ditunjukkan motilitas setelah simpan beku lebih rendah dibanding motilitas sperma sebelum simpan beku.

Kata kunci :

PENDAHULUAN

Simpan beku semen (*semen cryopreservation*) merupakan penyimpanan semen pada suhu sangat rendah dalam nitrogen cair. Pada simpan beku semen digunakan medium sebagai protektor. Salah satu manfaat simpan beku semen adalah sebagai sarana pendukung (*back up*) laboratorium teknik bantu reproduksi (*Assisted Reproductive Techniques/ART*) pada keadaan oligozoospermia, karena dengan simpan beku akan didapatkan jumlah spermatozoa yang lebih banyak melalui tuaian secara kolektif.

Hal yang perlu dipertimbangkan dalam simpan beku semen adalah dampak dari proses pendinginan. Proses pendinginan akan menyebabkan terbentuknya kristal es intrasellular yang pada saat penghangatan kembali (*thawing*) mengalami rekristalisasi. Kristal es hasil rekristalisasi ini merupakan faktor fisik yang dapat merusakkan struktur sel dan bahkan mengakibatkan kematian sel (Wetzels, 1996 ; Henry *et al.* 1993).

Motilitas merupakan salah satu faktor penting sebagai penentu kualitas sperma pada analisa sperma. Motilitas spermatozoa sangat menentukan keberhasilan spermatozoa menembus mukus serviks). Dengan demikian motilitas merupakan faktor penting yang menentukan keberhasilan proses fertilisasi. Turunnya motilitas spermatozoa akan berpengaruh pada terjadinya kehamilan (Mortimer,1994).

Berdasarkan uraian tersebut timbul permasalahan apakah simpan beku semen dengan medium TES-TYC akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa *post freezing* Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dampak simpan beku semen dengan medium TES-TYC. terhadap motilitas spermatozoa

TINJAUAN PUSTAKA

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 (Neischlag & Behre, 1996 ; Johnson & Everitt, 1988).

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 (Neischlag & Behre, 1996)

Mitokondria pada spermatozoa berada pada bagian tengah (*midpiece*) (Neischlag & Behre, 1996). 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 (Karp, 1996)

Pada proses pendinginan, 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 (Henry, 1993 ; Wetzels, 1996). Kristal es intrasellular ini saat penghangatan kembali (*thawing*) akan beragregasi dan dapat menyebabkan kerusakan bahkan kematian sel (Mazur, 1977).

Medium TES-TYC direkomendasikan sebagai *cryoprotective* medium untuk simpan beku spermatozoa manusia. Medium yang paling banyak digunakan pada simpan beku semen adalah medium TES-Tris yolk citrat (TES-TYC), medium ini dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* 83 % dari *pre freezing* (Prins & Weidel, 1986).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Andrologi Rumah Sakit Telogorejo Semarang. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium yang merupakan percobaan faktor

tunggal dengan rancangan dasar menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) (Munawar, 1995)

Sampel dalam penelitian ini adalah semen yang berasal dari pria dewasa, dengan kriteria inklusi yang diterapkan pada penelitian ini adalah : volume, leukosit, pH, viscositas semen, serta jumlah, motilitas dan motilitas spermatozoa sesuai kriteria yang diterapkan oleh WHO (Anonim,1999). Semen diperoleh dari 30 pria dewasa.

Parameter utama penelitian yang diamati adalah motilitas spermatozoa, yang diamati sebelum dan sesudah simpan beku (Mortimer, 1994 ; Spano *et. al.*, 1999). Pengujian ketepatan metode simpan beku dilakukan dengan menghitung *Cryosurvival Factor* (Mortimer, 1994).

Cara penelitian ini meliputi cara pembuatan medium TEST-Tris yolk citrat (TES-TYC) sesuai metode Winarso & Hinting,1999 ; Prins & Weidel (1986) ; Mortimer, (1994). Cara penyimpanan semen (*semen cryopreservation*) sesuai metode Winarso & Hinting (1999). Cara penuaian (*thawing*) sesuai dengan metode Weidel & Prins (1987).

Data hasil penelitian diuji normalitasnya dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dan dilanjutkan dengan uji homogenitas. hasil uji normalitas menunjukkan semua data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistik dengan menggunakan analisis parametrik dengan menggunakan uji T (Munawar, 1995 ; Santosa 1999).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis data sebelum dan sesudah simpan beku menunjukkan *cryosurvival factor* di atas 50%. Dengan demikian dapat dikatakan prosedur simpan beku pada penelitian ini sudah benar.

Tabel 1. Hasil penghitungan rerata motilitas spermatozoa sebelum dan setelah simpan beku (dalam %)

Motilitas <i>Pre Freezing</i>	Motilitas <i>Post Freezing</i>
58,70 ± 4,59 ^a	35,81 ± 3,06 ^b

Keterangan : Data yang diikuti *superscrip* yang berbeda menunjukkan berbeda nyata.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa *pre freezing* lebih tinggi dibanding *post freezing*. Hal ini menunjukkan bahwa proses simpan beku menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa.

Masalah utama dari simpan beku untuk semua jenis sel adalah kematian sel yang diakibatkan oleh terbentuknya kristal es intrasellular (Wetzels, 1996). Saat terjadi pembekuan, medium disekeliling sel membeku pada temperatur antara -5 °C sampai -15 °C. Keberadaan membran sel dapat berfungsi mencegah berkembangnya kristal es ekstrasellular ke arah intrasellular menyebabkan air intrasellular tidak membeku dan mengalami *supercooled* (Henry *et al.* 1993) Potensial kimia air yang mengalami *supercooled* lebih tinggi daripada potensial kimia air yang membeku di luar sel. Hal tersebut menyebabkan air berdifusi keluar sel (Critzter *et al.*,1987 ; Mazur,1977) yang mengakibatkan potensial kimia air intrasellular menembus membran, dan selanjutnya gradien potensial kimia air menurun secara cepat seiring dengan pelepasan panas laten sehingga menyebabkan temperatur intrasellular dan ekstrasellular menyatu sampai mencapai titik beku (Mazur,1977)

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 (Henry *et al.* 1993) Kerusakan tersebut pada akhirnya akan menurunkan laju pemecahan fruktosa oleh spermatozoa, dan menurunkan *uptake* oksigen sehingga ATP berkurang (Hafez, 1968). Mitokondria merupakan sumber energi bagi kehidupan sel, dengan demikian bila mitokondria mengalami kerusakan dapat dipastikan kemampuan gerakan sel akan mengalami penurunan.

Proses pendinginan merupakan faktor fisik yang dapat menyebabkan mikrotubulus mengalami kerusakan yang mengakibatkan terhentinya gerakan cilia (Constatinides, 1993). Menurut pendapat Neischlag & Behre (1996), 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. Dengan demikian dapat dikatakan proses simpan beku merupakan salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa.

Keberadaan gliserol dalam medium merupakan *cryoprotectant* yang sangat penting untuk mempertahankan *survival* selama dan sesudah simpan beku. (Weidel, and Prins, 1987) Sebagai *cryoprotectant* gliserol merupakan substansi *permeating* (Critzter et al.,1987) 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 (Wetzels,1996)

KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa proses simpan beku menyebabkan kerusakan struktur spermatozoa, yang ditunjukkan dengan rendahnya motilitas spermatozoa *post freezing*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., D. Ray, J. Lewis, K. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 1994 Molecular Biology of the cell. 3rd Edition. Garland Publishing Inc. New York. pp 483 – 502.
- Anonim. 1999. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm- cervical mucus interaction.4th Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Critzter, J.K., A.R. Huse-Benda, D.V. Aaker, B.W. Arneson, G. David Ball. 1987. Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effect of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction *Fertil Steril.* 47 :656-663.
- Constatinides, P.1993. General Pathology. Appleton & Lange. pp39– 42 Connecticut
- Girraud, M.N., C. Motta, D. Boucher, and G. Grizard. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome cryopreservation of human spermatozoa. *J. Hum. Reproduction.* 15 (10) : 2160 - 2164.
- Hafez, E.S.E. 1968. Reproduction in Farm Animals. 2nd Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. pp 51 - 56.
- Hallack J., R.S. Sidhu, A.J. Thomas Jr. 1996. Effect of test yolk buffer and glycerol cryoprsvation on human speramtozoa morphology and function. ASRM Abstracts.

- Henry, M.A., E.E. Noiles, D. Gao, P. Mazur, J.K. Critzer. 1993. 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.* 60 (5) : 911 – 917.
- Hinting,A. 1999. *Assisted Reproductive Technology* Pada Infertilitas Pria Laboratorium Biomedik FK Unair. Surabaya
- Johnson M., B. Everitt, 1988. *Essential Reproduction*. 3rd Edition.Oxford. Blackwell scientific Publ. : 52-62.
- Karp G., 1996. *Cell and Molecular Biologi Concepts and Experiments*. New York. John Wiley & Sons, INC. : 177-179
- Mazur P. 1977. The Role of intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates. *J. Cryobiology.* 14 : 251-272
- Mortimer D. 1994. *Practical laboratory andrology*. University Press. New York Oxford pp 301 –320.
- Munawar. *Biometri II*. 1995. Jurusan Biologi FMIPA UNSRI. Palembang.
- Nieschlag, E., & H.M. Behre. 1996 *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer Publ. Berlin. pp 65 – 105
- Polcz T.E., J.B. Stronk, G.B. Huszar. 1996. Repeated Cryopreservation of Ejaculated Human Spermatozoa, Recovery and Maintenance of Sperm Motility and Viability.. *ASRM Abstract*.
- Price, S.A., & L.M. Wilson. 1995 *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Penerjemah Peter Anugrah. Edisi 4. Jakarta. EGC 22-28
- Prins, G.S. & L. Weidel. A. 1986. Comparative study of buffer system as cryoprotectant for human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 46 : 147 – 149.
- Santoso Singgih. *SPSS (Statistical Product and Service Solution)*. 1999. Jakarta : PT Elex Media Komputindo, 300 – 380.
- Spano M, E. Cordell, G. Leter, F. Lombardo, A. Lenzi, and L. Gandini. 1999. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Molecular. J. Human Reproduction.* 5 (1) : 29 – 37.
- Weidel L., and G.S. Prins. 1987. Cryosurvival of Human Spermatozoa Frozen in Eight Different Buffer Systems. *J. Androl.* 8 : 41 – 47.
- Wetzels, A.M.M. 1996. *IVF Laboratory aspects of in-vitro fertilization*. N.V. Organon. Netherlands. pp 228 – 240.

Winarso, H. & A. Hinting. 1999. Simpan beku sperma manusia. Post graduate course Penatalaksanaan infertilitas pria dan analisis semen. FK Unair. Surabaya.

