

# **Morfologi Spermatozoa Manusia setelah Simpan Beku dengan Medium *TES-Tris Yolk Citrat* (TES-TYC)**

**Muhammad Anwar Djaelani\***

Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan  
Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang  
\*muhammadanwardjaelani@rocketmail.com

## **ABSTRACT**

The aim of this research was to evaluate the effect of semen cryopreservation using TES-Tris yolk citrat (TES-TYC) medium on morphology of the sperm. Semen fulfilling inclusion criteria with WHO criteria. The sperm vitality was counted by initial data. The semen was mixed with TES-TYC medium and cryopreserved in liquid nitrogen. After one month the semen was thawed and recounted its sperm morphology. The data showed that the morphology of post freezing sperm cryopreserved was not significant different compared to the morphology of pre freezing sperm. It could be concluded that morphology of human sperm could not as indicator to evaluate the effect of semen cryopreservation using TES-Tris yolk citrat (TES-TYC).

*Key word : Sperm Morphology, semen cryopreservation.*

## **ABSTRAK**

Penelitian tentang morfologi spermatozoa manusia setelah simpan beku dengan medium TES-Tris yolk citrat (TES-TYC) bertujuan untuk mengevaluasi dampak simpan beku semen terhadap morfologi spermatozoa. Semen yang memenuhi kriteria inklusi sesuai dengan kriteria WHO, dilakukan penghitungan morfologinya sebagai data awal. Selanjutnya semen dicampur dengan medium TES-TYC kemudian disimpan beku dalam nitrogen cair. Setelah tersimpan satu bulan spermatozoa dituai kemudian dihitung kembali morfologinya. Data yang didapat menunjukkan bahwa morfologi spermatozoa *post freezing* tidak berbeda bermakna dengan morfologi spermatozoa *pre freezing* Dapat disimpulkan bahwa data morfologi spermatozoa tidak dapat dijadikan indikator untuk melihat dampak simpan beku spermatozoa dengan menggunakan medium simpan beku TES-Tris yolk citrat (TES-TYC).

*Kata kunci : Morfologi spermatozoa, simpan beku semen*

## **PENDAHULUAN**

Simpan beku semen (*semen cryopreservation*) merupakan penyimpanan semen pada suhu sangat rendah dalam nitrogen cair, dengan medium simpan beku tertentu sebagai protektor. Simpan beku semen digunakan untuk menanggulangi masalah dalam reproduksi, baik pada manusia maupun hewan. 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 mengakibatkan kerusakan sel hingga sel mengalami kematian (Wetzels, 1996; Henry *et al.*, 1993). Penggunaan medium simpan beku dapat mempertahankan agar spermatozoa tidak mengalami kerusakan selama simpan beku.

Medium yang banyak digunakan adalah medium *TES-Tris yolk citrat* (TES-TYC) (Weidel & Prins, 1987). Penelitian Prins & Weidel (1986) menunjukkan medium TES-TYC dapat mempertahankan motilitas spermatozoa *post freezing* 83 % dari *pre freezing*. Mengingat hal tersebut medium TES-TYC direkomendasikan sebagai cryoprotective medium untuk simpan beku spermatozoa manusia (Weidel & Prins, 1987; Hallack *et.al.*,1996). Berdasarkan uraian tersebut di atas timbul permasalahan apakah medium TES-TYC dapat melindungi spermatozoa manusia selama proses simpan beku sehingga spermatozoa tidak mengalami perubahan morfologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dampak simpan beku semen dengan medium TES-TYC terhadap morfologi spermatozoa setelah simpan beku.

Pada proses pendinginan, ketika titik beku dicapai air

intraselular 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 intraselular ini saat penghangatan kembali (*thawing*) akan beragregasi dan dapat menyebabkan kerusakan sel yang berakibat kematian sel (Mazur,1977). Kematian sel dapat diketahui dengan pengujian vitalitas spermatozoa (Girraud *et. al.*, 2000). 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. Medium tersebut merupakan medium yang dapat mempertahankan motilitas

spermatozoa *post thawing* relatif tinggi, oleh karena itu medium tersebut direkomendasikan sebagai *cryoprotective medium* untuk simpan beku spermatozoa manusia. Medium TESTYC mengandung TES-Tris dan Na-sitrat sebagai buffer, gliserol sebagai *cryoprotectant*, kuning telur, dan fruktosa sebagai sumber energi. TES-Tris merupakan buffer yang berfungsi baik pada *pre-freeze* maupun *post-thawing*. TES-Tris buffer dapat mengikat ion hidrogen pada medium sehingga mempercepat proses dehidrasi. (Weidel & Prins, 1987)

Gliserol dalam medium merupakan *cryoprotectant* yang dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan berlangsung (Winarso & Hinting, 1999). 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 (Prins & Weidel, 1986).

Kuning telur dalam medium TES-TYC bukan merupakan *cryoprotectant* tetapi berfungsi mempertahankan fluiditas membran sel (Mortimer,1994). 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. (Mortimer,1994 ; Albert *et al.*,1994 ; Hafez, 1968). Kuning telur ayam

merupakan salah satu komponen medium TES-TYC (Prins & Weidel, 1986). Struktur dan fungsi spermatozoa *post freezing* yang disimpan dengan medium TES-TYC lebih baik dibanding struktur dan fungsi spermatozoa *post freezing* yang disimpan dengan gliserol saja (Hallack *et al.*,1996).

Fluiditas merupakan hal penting secara biologis bagi membran sel (Albert *et al.* 1994). 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*) (Albert *et al.*, 1994 ; Anonim, 2000)

Fruktosa dengan konsentrasi 2 % dalam medium TESTYC merupakan penyimpan sumber energi bagi spermatozoa pada kondisi *in vitro*, sedangkan keberadaan sitrat pada medium berfungsi sebagai buffer dan tersusun dalam bentuk Na-sitrat. 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.

## ***METODE PENELITIAN***

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai rancangan dasar (Munawar, 1995) Pelaksanaan Penelitian ini menggunakan fasilitas Laboratorium Andrologi Rumah Sakit Telogorejo Semarang.

Semen yang diambil dari 30 pria dewasa digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Penelitian ini menggunakan kriteria inklusi meliputi : volume semen, jumlah leukosit dalam semen, pH semen, kekentalan semen, dan jumlah, motilitas serta vitalitas spermatozoa sesuai kriteria WHO (Anonim,1999). Tiga puluh sampel semen tersebut kemudian ditambahkan medium TES-TYC selanjutnya disimpan beku dalam nitrogen cair

Variabel penelitian ini adalah morfologi spermatozoa yang diamati sebelum dan sesudah simpan beku. Pengujian ketepatan metode simpan beku dilakukan dengan menghitung

*Cryosurvival Factor* (Mortimer, 1994).

Pembuatan medium TEST-Tris yolk citrat (TES-TYC) sesuai metode Winarso & Hinting, 1999 ; Prins & Weidel 1986 ; Mortimer, 1994. Penyimpanan semen (*semen cryopreservation*) sesuai metode Winarso & Hinting (1999). Penuaian (*thawing*) semen sesuai dengan metode Weidel & Prins (1987).

Data hasil penelitian diuji pola distribusinya dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dan dilanjutkan dengan uji homogenitas variansi. Hasil uji pola distribusi menunjukkan semua data mengikuti pola distribusi normal dan variansinya homogen maka untuk melihat perbedaan jumlah morfologi spermatozoa normal sebelum simpan beku dan morfologi spermatozoa normal setelah simpan beku dilakukan uji statistik menggunakan analisis parametrik dengan menggunakan uji t (Munawar, 1995). Analisis statistik dilakukan dengan

menggunakan program komputer SPSS (Santosa, 1999)

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

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

Morfologi sebelum simpan beku	Morfologi setelah simpan beku
23,20 ± 4,09 <sup>a</sup>	22,65 ± 3,89 <sup>a</sup>

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

Price & Wilson (1995), 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. Pada pengamatan morfologi spermatozoa terlihat spermatozoa yang mengalami kematian tersebut berbentuk seperti morfologi spermatozoa normal yang lain, kemungkinan yang menyebabkan morfologi spermatozoa setelah simpan beku tidak berbeda bermakna dengan morfologi spermatozoa sebelum simpan beku. 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. Selanjutnya menurut Price & Wilson (1995), selama dapat bertahan pada kondisi pembengkakan, bila sel tersebut tidak pecah maka dapat kembali pada kondisi normal. 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 setelah simpan beku 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 lain yang menyebabkan morfologi spermatozoa setelah simpan beku tidak berbeda bermakna dengan morfologi spermatozoa sebelum simpan beku ( $p > 0,05$ ). Menurut Underwood (1995), kerusakan akibat trauma mekanik yang parah adalah robeknya membran sel sehingga menyebabkan sitoplasma keluar. 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 (1994), dalam penghitungan prosentase morfologi tidak dihitung sebagai spermatozoa. Spermatozoa setelah simpan beku yang mengalami plasmolisis tidak terhitung sebagai spermatozoa. Hal tersebut di atas merupakan kemungkinan berikutnya yang menyebabkan morfologi spermatozoa setelah simpan beku tidak berbeda bermakna dengan morfologi spermatozoa sebelum simpan beku ( $p > 0,05$ ). Kemungkinan lain 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.

## **KESIMPULAN**

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa data morfologi spermatozoa tidak dapat dijadikan indikator untuk melihat dampak simpan beku spermatozoa dengan menggunakan medium simpan beku TES-TYC.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Alberts, B., D. Ray, J. Lewis, K. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the cell*. 3<sup>rd</sup> 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. 4<sup>th</sup> Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Anonim. 2000. Cell Membrane. <http://www.altavista.com>
- Critzer, J.K., A.R. Huse-Benda, D.V. Aaker, B.W. Arneson, G. David Ball. 1988. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The Effect of Cryoprotectant on Motility. *Fertil Steril.* : 50(2) : 314-320.
- 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. 2<sup>nd</sup> Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. pp 51-56.
- Hallack J., R.S. Sidhu, A.J. Thomas Jr. 1996. Effect of test yolk buffer and glycerol cryopreservation on human spermatozoa 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.
- Johnson M., B. Everitt, 1988. *Essential Reproduction*. 3<sup>rd</sup> Edition. Oxford. Blackwell scientific Publ. : 52-62.
- 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 Patofisiologi Konsep Klinis Proses - Proses Penyakit. Penerjemah Peter Anugrah. Edisi 4. Jakarta. EGC 1995 : 22-28
- Prins, G.S. & L. Weidel. A. 1986. Comparative study of buffer system as cryoprotectant for human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 46:147-149.
- Romanoff A.L., Anastasia J. Romanoff. 1963. The avian egg. 2<sup>nd</sup> Edition. New York. John Willey & Sons Inc. 311 - 343.
- Santoso Singgih. SPSS (Statistical Product and Service Solution). 1999. Jakarta : PT Elex Media Komputindo, 300 - 380.
- Underwood, J.C.E., Patologi Umum dan Sistemik. Penerjemah Sarjadi. Edisi 1 Jakarta. EGC. 1994 : 115-120.
- 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.