

Peran Kuning Telur pada Medium Simpan Beku Semen
***TES-Tris Yolk Citrat* terhadap Motilitas dan Vitalitas Spermatozoa**
Manusia *Post Freezing*.

Muhammad Anwar Djaelani*

**Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedharto, Kampus Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang*

Abstract

The aim of this research was to examine the possibility of semen cryopreservation using TES-Tris yolk citrat (TES-TYC) medium without egg yolk. Semen fulfilling inclusion criteria with WHO criteria was divided into two groups. The semen was then mixed with TES-TYC medium and TES-TYC medium without egg yolk and cryopreserved in liquid nitrogen. After one month the semen was thawed and recount its sperm motility and vitality. Data obtained showed that the motility and vitality of post freezing sperm cryopreserved with TES-TYC medium was higher compared to TES-TYC medium without egg yolk. It could be concluded that the existed of egg yolk in TES-TYC medium was kept sperm integrity during cryopreservation, hence the existed of egg yolk as ingredient in TES-TYC medium was needed.

Key words : motility, vitality, semen cryopreservation

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemungkinan simpan beku semen dengan menggunakan medium TES-Tris yolk citrat (TES-TYC) tanpa kuning telur. Semen yang digunakan sesuai kriteria WHO dibagi menjadi dua kelompok. Semen kemudian dicampur dengan medium TES-TYC dan medium TES-TYC tanpa kuning telur selanjutnya disimpan dalam nitrogen cair. Setelah satu bulan semen dituai dihitung motilitas dan vitalitas spermatozoanya. Data menunjukkan motilitas dan vitalitas spermatozoa yang disimpan dengan medium TES-TYC lebih tinggi dibanding motilitas dan vitalitas spermatozoa yang disimpan dengan medium TES-TYC tanpa kuning telur. Dapat disimpulkan bahwa keberadaan kuning telur dalam medium TES-TYC berperan dalam menjaga keutuhan spermatozoa selama simpan beku, dengan demikian keberadaan kuning telur dalam medium TES-TYC tetap diperlukan

Kata kunci: motilitas, vitalitas, 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 penggunaan medium simpan beku. Medium simpan beku digunakan untuk mempertahankan agar spermatozoa tidak mengalami kerusakan selama simpan beku.

Medium yang digunakan pada simpan beku semen antara lain gliserol, medium ini dapat mempertahankan spermatozoa *post freezing* 31 % dibanding motilitas spermatozoa

pre freezing (Weidel & Prins, 1987). Medium yang terdiri atas campuran gliserol dan kuning telur ayam dapat mempertahankan motilitas spermatozoa post freezing 49% dari motilitas spermatozoa pre-freezing. Medium lain yang juga 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*. Oleh karena itu medium TES-TYC direkomendasikan sebagai cryoprotective medium untuk simpan beku spermatozoa manusia (Weidel & Prins, 1987 ; Hallack *et.al.*,1996).

Kuning telur merupakan bahan organik yang berasal dari makhluk hidup, dengan demikian sulit untuk dilakukan sterilisasi tanpa mengalami kerusakan. Bila kuning telur digunakan sebagai bahan baku pembuatan medium simpan beku semen maka medium tersebut tidak akan dapat bertahan lama karena mudah terkontaminasi mikroorganisme sehingga akan cepat mengalami pembusukan. Dengan demikian bila simpan beku menggunakan medium dengan bahan baku kuning telur akan merupakan pemborosan.

Berdasarkan uraian tersebut di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk menguji apakah kuning telur ayam dalam medium TESTYC tetap diperlukan. Penelitian ini bertujuan menjajagi kemungkinan penggunaan TESTYC tanpa kuning telur ayam. terhadap

motilitas dan vitalitas spermatozoa *post freezing*.

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).

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 (Hafez,1968).

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).

Istilah vitalitas spermatozoa mengacu pada istilah viabilitas spermatozoa. Pengujian vitalitas dilakukan bila prosentase spermatozoa *immotile* melebihi 50 % (Anonim,1999). Dengan berkembangnya *Inter Cytoplasmic Sperm Injection* (ICSI) maka uji vitalitas ini menjadi sangat penting, karena dapat membedakan sel mati dari sel yang hidup yang dapat digunakkan untuk ICSI (Girraud *et. al.*, 2000 ; Polcz,1996)

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 TESTYC 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).

METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan fasilitas Laboratorium Andrologi Rumah Sakit Telogorejo Semarang. Rancangan dasar yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Munawar, 1995)

Probandus pada penelitian ini adalah pria dewasa sebanyak 30 orang. Semen yang diambil dari probandus digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Kriteria inklusi yang diterapkan pada penelitian ini meliputi : volume semen, jumlah leukosit dalam semen, pH semen, kekentalan semen, dan jumlah, motilitas serta vitalitas spermatozoa sesuai kriteria WHO (Anonim,1999). Semen yang berasal dari satu orang dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, dengan demikian terdapat dua perlakuan dan 30 ulangan. Kelompok perlakuan A menggunakan medium

simpan beku TES-TYC, sedangkan kelompok perlakuan B menggunakan medium simpan beku TES-TYC tanpa kuning telur

Variabel penelitian meliputi motilitas dan vitalitas spermatozoa, yang diamati sesudah simpan beku (Mortimer, 1994 ; Spano *et. al.*, 1999). 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 antar kelompok perlakuan dilakukan uji statistik dengan menggunakan analisis parametrik dengan menggunakan uji t (Munawar, 1995). Analisis statistik menggunakan program komputer SPSS (Santosa, 1999)

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Pada penelitian motilitas spermatozoa manusia setelah simpan beku dengan medium TES-TYC menunjukkan motilitas spermatozoa *post freezing* TES-TYC $35,81 \pm 3,08$ dan vitalitas spermatozoa *post freezing* TES-TYC $48,01 \pm 4,35$ (Djaelani dan Agung, 2009). Motilitas dan vitalitas spermatozoa *post freezing* pada penelitian tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan motilitas dan vitalitas spermatozoa *post freezing* yang disimpan dengan medium TES-TYC tanpa kuning telur yang dilakukan pada penelitian ini. Hal ini dapat dipahami sesuai dengan pendapat Mortimer, (1994) yang menyatakan bahwa kuning telur dalam medium TES-TYC berfungsi mempertahankan fluiditas membran sel 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 ; Hafez, 1968 ; Albert *et al.* 1994)

Tabel 1. Motilitas dan Vitalitas spermatozoa *post freezing* (dalam %)

Medium	Motilitas	Vitalitas
TESTYC tanpa kuning telur	29,94 ± 2,79	40.14 ± 3,35

Keterangan : A : Dengan medium TESTYC

B : Dengan medium TESTYC tanpa kuning telur

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

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)

Keberadaan kuning telur dalam medium TES-TYC dengan kuning telur akan menyebabkan medium tersebut mengandung kolesterol. Keberadaan kolesterol pada kuning telur menyebabkan kandungan kolesterol pada

medium TES-TYC 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 besar pada saat *thawing* juga berkurang, kerusakan sel juga berkurang.

Gangguan metabolisme pembentukan energi dan *defect* aksonema 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 (Anonim, 1999). Dengan demikian dapat dipahami bila data vitalitas spermatozoa lebih tinggi dari pada data motilitas spermatozoa.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa selama simpan beku kuning telur berperan menjaga integritas spermatozoa sehingga keberadaannya sebagai bahan baku medium TESTYC tetap diperlukan.

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.
- Anonim. 2000. Cell membrane. <http://www.altavista.com>.
- Critzer, 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
- Djaelani, M.A., Agung Janika S, 2009, Motilitas spermatozoa manusia setelah simpan beku dengan medium TES-TYC, *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, Vol XVII (1) : 38-45
- 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.
- Johnson M., B. Everitt, 1988. Essential Reproduction. 3rd 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.
- 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*.
- 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.

