SEGI IMUNOLOGIS INFERTILITAS PASANGAN SUAMI ISTRI DAN METODE-METODE PEMERIKSAANNYA

oleh

KOENTJORO SOEHADI dan K.M. ARSYAD

SEKSI ANDROLOGI
BAGIAN BIOLOGI, FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
1982

SEGI IMUNOLOGIS INFERTILITAS PASANGAN SUAMI ISTRI DAN METODE-METODE PEMERIKSAANNYA

oleh

dr. KOENTJORO SOEHADI

Seksi Andrologi, Bagian Biologi
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Surabaya

dan

dr. K.M. ARSYAD

Sub-Bagian Andrologi dan Biologi Reproduksi
Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya
Palembang

SEKSI ANDROLOGI
BAGIAN BIOLOGI, FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
1982

PENGANTAR

Naskah asli buku ini adalah kertas kerja pada Simposium Alergi dan Imunologi, yang diadakan oleh Unit Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, pada tanggal 5 September 1981 di Surabaya.

Naskah asli ini telah mengalami beberapa perbaikan redaksional dan isinya.

Penulis bermaksud untuk lebih memperbaiki isi buku ini lebih lanjut, karena masalah imunologis dalam bidang infertilitas pasangan suami istri merupakan hal yang perlu mendapat perhatian.

Saran membangun guna perbaikan buku ini selalu kami harapkan.

Koentjoro Soehadi

K.M.Arsyad.

SEGI IMUNOLOGIS INFERTILITAS PASANGAN SUAMI ISTRI DAN METODA-METODA PEMERIKSAANNYA

Oleh :
dr.Koentjoro Soehadi *
dr.K.M. Arsyad **

Pendahuluan

Sejak lebih kurang 80 tahun yang lalu, telah diketahui bahwa dalam proses fertilisasi berperan faktor imunologis. Hal ini diperkuat oleh pemeriksaan hewan percobaan, maupun laporan klinis.

Pemikiran dasar adanya proses imunologis tersebut ialah masuknya sperma ke dalam traktus genitalis wanita. Sperma yang merupakan zat komplek berasal dari testis, epididimis duktus ejakulatorius dan kelenjar asesori lelaki, dianggap benda asing bagi tubuh wanita, yang dapat menyebabkan timbulnya proses imunologis.

Secara teoritis, sejak masuknya sperma ke dalam traktus genitalis sampai implantasi, dapat merupakan tempat terjadinya proses imunologis. Proses imunisasi wanita oleh karena masuknya antigen sperma merupakan proses isoimunisasi. Sebaliknya, komponen imunologik sperma dapat pula menyebabkan timbulnya proses imunologik terhadap spermatozoanya sendiri, yang dapat menyebabkan timbulnya autoimunisasi.

Timbulnya proses isoimunisasi maupun autoimunisasi dapat menyebabkan berbagai kelainan kualitas maupun kuantitas spermatozoa, yang diduga (meskipun tidak selalu) menjadi penyebab infertilitas pasangan suami istri (Schumacher, G.F. 1979).

Beberapa kasus infertilitas pasangan suami istri yang belum dapat ditentukan penyebabnya (meskipun jumlahnya relatif kecil), diduga karena proses imunologik.

---

*) Seksi Andrologi, Bagian Biologi
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

**) Sub-Bagian Andrologi dan Biologi Reproduksi, Bagian Biologi
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang;
WHO trainee pada Seksi Andrologi, Bagian Biologi
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Dipandang dari segi penanganan masalah infertilitas pasangan suami istri, maka aspek imunologis, baik dari fihak wanita, maupun lelaki perlu diteliti lebih lanjut.

Tulisan di bawah ini mengemukakan aspek imunologis pasangan suami istri, serta beberapa cara praktis untuk menguji adanya proses imunologis pada pasangan suami istri, khususnya dari segi infertilitas lelaki.

Isoimunisasi pada wanita oleh antigen sperma

Terdapat beberapa hal yang menyebabkan terjadinya isoimunisasi pada wanita karena masuknya antigen sperma.

Pada traktus genitalis wanita, terutama uterus, terdapat banyak sel makrofag dan sel-sel yang memungkinkan terjadinya proses imunitas. Hal ini menyebabkan terjadinya mekhanisme aferen imunologis setelah koitus. Keadaan itu di pengaruhi oleh beberapa hal sebagai berikut :

1. Adanya jutaan spermatozoa yang terdapat di dalam vagina, sedang hanya satu spermatozoa yang berguna untuk fertilisasi. Sebagaian besar spermatozoa mengadakan ikatan dengan imunoglobulin, dengan demikian menghambat proses imunitas. Cohen dan Gresson (1978) menemukan bahwa sebagian terbesar sperma setelah koitus mengadakan interaksi dengan antibodi.
2. Kecenderungan terjadinya spermatozoa oleh sel somatik servik uteri, dan adanya daya tarik khemotaksis sperma oleh makrofag.
3. Kemungkinan adanya antigen lain yang ikut masuk kedalam traktus genitalis wanita. Berbagai infeksi karena T-mikoplasma Stafilokokus dan protozoa memungkinkan timbulnya antibod terhadap spermatozoa. Karena alasan ini pula maka para pelacur diperkirakan kebanyakan infertil.

Uterus, terutama servik, merupakan tempat utama aktifitas sekretorik imunologik traktus genitalis wanita dan endometrium uteri serta tuba Falopii, berperanan kecil pada aktifitas tersebut.

Ransangan antigenik pada lapisan mukosa menyebabkan terbentuknya antibodi, baik lokal maupun sistimik.

Sifat-sifat imunologis servik dan sekresinya dapat disimpulkan sebagai berikut :

a. Servik mempunyai banyak sel plasma yang dapat mensekresi imunoglobulin.

b. Mukus servik juga mengandung komponen penting untuk antibodi lokal yang menyebabkan imunitas (SIgA, IgA , IgG dan juga faktor komplemen).

c. Bilamana terjadi infeksi vagina oleh E Coli, Kandida albikans, Trikhomonas vaginalis, Gonokokus, dapat memprovokasi respon sel plasma di servik dan terbentuk antibodi spesifik (terutama IgA) pada mukus.

Imunitas humoral terhadap sperma

Heaker (1922) adalah orang pertama yang menemukan faktor imunologis dalam serum wanita - infertil - tanpa - sebab, yang mengakibatkan sitolitis spermatozoa.

Franklin dan Dukes (1964) kemudian menemukan aktifitas aglutinasi pada serum wanita infetil, yang mampu menggumpalkan spermatozoa. Setelah itu berbagai kasus tentang kadar antibodi terhadap spermatozoa dilaporkan pada wanita fertil maupun infertil.

Kecuali faktor yang dapat menggumpalkan (aglutinasi) spermatozoa, terdapat pula yang mampu mengimobilisasikan spermatozoa.

Sekelompok wanita infertil yang tidak jelas sebabnya dianggap mempunyai "immune infertility". Hal ini diduga bahwa infertilitasnya banyak berkurang karena aktifitas antibodi yang berpengaruh pada spermatozoa.

Berbagai cara dan metoda dapat digunakan untuk mengetahui aktifitas antibodi terhadap spermatozoa, baik antibodi yang mampu mengadakan aglutinasi, imobilitas dan sitotoksisitas pada spermatozoa. Berbagai macam antibodi tersebut terdapat di dalam serum wanita,yang dapat menimbulkan imunitas humoral.

Imunitas lokal terhadap sperma

Seperti telah dikatakan di atas bahwa rangsangan antigenik dapat menyebabkan imunitas lokal pada alat reproduksi wanita.

Imunitas lokal dapat mempengaruhi sistim reproduksi wanita dengan jalan seperti hal-hal di bawah ini (Jones, W.R. 1980) :

1. Menggunakan makrofah dan mempercepat fagositosis spermatozoa pada genitalia wanita.
2. Mematikan (sitotoksis) dan mengimobilisasikan spermatozoa bilamana terdapat cukup komplemen untuk terjadinya imobilisasi.
3. Mengaglutinasikan spermatozoa, yang menyebabkan kemampuan penetrasi spermatozoa pada mukus serviks berkurang.
4. Mempengaruhi proses kapasitasi spermatozoa.
5. Mempengaruhi seleksi spermatozoa dalam alat reproduksi wanita untuk dapat mencapai sasaran fertilisasi.

Sayangnya keadaan imunitas lokal tak mencerminkan derajat imunitas humoral. Hal ini disebabkan karena berbagai alasan, misalnya :

Kelainan kualitas spermatozoa di dalam mukus servik (Pada Tes Pos Koitus) tak selalu disebabkan karena faktor imunitas lokak, maupun sistemik.

Kadar antibodi dalam serum tidak selalu sama dengan kadar antibodi anti spermatozoa pada alat reproduksi wanita.

Hal ini dapat diketahui karena tak ada korelasi/korelasi lemah antara aktifitas antibodi antispermatozoa dan daya hidup (survival) spermatozoa pada alat genitalia wanita. (Glass dan Widya, 1970. Hanafiah et al. 1972 Waldman et al 1972).

Antibodi antispermatozoa pada lelaki

Ejakulat yang terdiri dari plasma sperma dan spermatozoa merupakan antigen. Antigen diperkirakan terbentuk pada stadium spermatosit.

Sebagian terbesar sperma dikeluarkan dari tubuh, sejak dibentuknya, melalui ejakulasi. Dengan adanya blood-testis barrier, maka tidak terjadi transfer antigen, antibodi atau sel-imun dari lumen tubuli seminiferi ke dalam sirkulasi darah dan sebaliknya.

Bilamana terjadi kebocoran barier darah-testis, antigen, antibodi atau sel-imun akan masuk sirkulasi darah, dan dapat menimbulkan antibodi terhadap spermatozoanya sendiri. Hal ini yang menyebabkan terjadinya autoimunitas pada lelaki (Menge and Berhman, 1979).

Autoimunitas dapat terjadi karena berbagai hal, misalnya : Trauma, akibat operasi, infeksi (prostatitis, vesikulitis, epididimoorkhitis), obstruksi dan atrofi akibat infeksi atau trauma (Rumke,1968 ; Mancini 1971 ; Eyquem dan D'Almeida, 1973). Dalam keadaan ini pembentukan antibodi bersifat sekunder akibat terjadinya proses-proses tersebut dengan akibat extravasasi dan resorbsi sperma ke dalam jaringan intersitial. Tentang hubungan antara obstruksi saluran genitalia dengan timbul dan beredarnya aglutinin spermatozoa belum jelas, karena pada 75% lelaki dengan gangguan obstruksi tidak terjadi antibodi (Rumke, 1968) Sebaliknya beberapa pasen dengan aglutinin spermatozoa yang kemudian sembuh karena operasi akan terus menunjukkan titer aglutinasi positif (Phadke dan Padukoni, 1964) Studi pada lelaki dengan atrofi endokrin primer atau sekunder menunjukkan bahwa kegagalan spermatogenesis sendiri tidak berkaitan dengan adanya antibodi pengaglutinasi spermatozoa.

Terbentuknya antibodi terhadap spermatozoa sendiri menyebabkan aglutinasi dan imobilisasi spermatozoa segera setelah ejakulasi. Meskipun demikian hal ini tidak selalu menyebabkan gangguan fertilitas (Schumacher G.F. 1977 ; Hendry et al. 1978).

Antibodi spermatozoa terdapat dalam plasma sperma hanya kalau titer yang terdapat dalam serum cukup tinggi.
Menurut penelitian Rumke (1974) terdapat korelasi positif antara titer antibodi yang tinggi dengan lamanya infertilitas.
Rumke dan Hellinga (1959) menunjukkan adanya titer antibodi rendah dalam serum pada lelaki fertil.
Ejallbrant 1968 menunjukkan terdapat titer autoantibodi pengaglutinasi spermatozoa pada kelompok lelaki fertil sebesar 2.6%, sedangkan pada kelompok lelaki infertil sebesar 6.8%.

Metode pemeriksaan imunologis pasangan suami istri infertil.

Karena pada fihak lelaki terdapat kemungkinan adanya autoantibodi terhadap spermatozoanya sendiri, maka sebenarnya pemeriksaan imunologis pasangan suami istri dapat dimulai pada fihak lelaki, baru kemudian dilaksanakan pada fihak istri atau bersamaan.

1. Aglutinasi spermatozoa pada sperma segar.

Pada pemeriksaan analisis sperma rutin, terdapat parameter sperma yang berkaitan dengan m lah imunologis, ialah aglutinasi spermatozoa.

Aglutinasi spermatozoa dapat disebabkan karena faktor imunologis maupun non imunologis. Cara untuk membedakan aglutinasi non imunologis (aglitinasi palsu) dengan yang diduga aglutinasi yang sejati(imunologis?) ialah dengan beberapa cara :

Dengan pemberian larutan garam fisiologis. Kalau terjadi aglutinasi palsu, maka spermatozoa akan lepas. Pada aglutinasi sejati sperma-tozoa akan tetap menggumpal atau menggerombol.

Cara yang kedua ialah yang dikemukakan oleh Hellinga (1976. Setetes sperma segar, setelah likuefaksi total, diletakkan pada gelas obyek, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Sediaan ini dibiarkan, tidak disentuh sedikitpun, selama paling sedikit satu jam. Pada sperma normal, spermatozoa tersebut tak akan saling bersentuhan satu sama lain. Tetapi pada sperma yang mengandung aglutinin akan bersentuhan satu sama lain dan akan menggerombol. Penggerombolan tersebut terjadi dengan berbagai cara.

1*. Ujung atau bagian ekor yang lebih proksimal bersentuhan satu sama lain, sedangkan kepalanya bergerak-gerak bebas.
Agglutinasi semacam ini dinamakan agglutinasi Tail-to-Tail (TT).

2*. Kepala dan kepala spermatozoa bersentuhan dan menggerombol.
Sedangkan ekornya dapat dilihat bergerak-gerak bebas. (HH).

3*. Bila kedua hal tersebut terjadi, yaitu baik kepala dengan kepala kemudian ekor dengan kepala menggerombol, maka terdapat agglutinasi Head to Tail (HT).

4*. Bila sperma terdapat menggerombol pada suatu sel muda spermatozoa atau pada lekosit, maka hal ini dinamakan pseudoagglutinasi.

5*. Bila spermatozoa menggerombol seperti benang pada pinggir suatu daerah, maka hal itu disebabkan karena proses likuefaksi. Ini dinamakan string agglutination.

Pada keadaan 1,2 dan 3 terdapat titer agglutinin tertentu dalam tubuh lelaki. Keadaan 4 dan 5 tak ada hubungannya dengan proses immunologi.

Koentjoro Soehadi dan Arsyad (1981) memeriksa sperma dari 262 lelaki dari pasangan suami istri infertil mendapatkan 26% menunjukkan aglutinasi spermatozoa pada ejakulat segar (4,15%). Dari 26 sperma, 19 (3%) menunjukkan aglutinasi palsu dan 7 sperma (1,15%) aglutinasi sejati.

2. Pemeriksaan Tes Pos Koitus (Post Coital Test = PCT)

PCT adalah suatu tes yang digunakan untuk menguji faktor serviks terhadap aktivitas spermatozoa.

Tes Pos koitus atau Tes Sims-Hühner (tes SH) dilaksanakan dengan mengambil mukus serviks pasangan suami istri yang telah bersanggama beberapa jam sebelumnya (lk 6 jam).

Suami dianjurkan melaksanakan abstinesia selama 3 - 5 hari, istri diperkirakan dalam keadaan fase ovulasi.

Tes SH amat penting karena dapat mengevaluasi atau memberi informasi tentang :

* Tehnik koitus pasangan suami istri.
* Kualitas dan sifat-sifat fisik mukus serviks.
* Kualitas sperma dan spermatozoa.
* Bagaimana pengaruh mukus serviks terhadap spermatozoa.

* Fungsi ovarium secara indirek.

Syarat agar PCT dianggap positif, masih menjadi bahan perdebatan. Ada yang mengatakan PCT pos. kalau terdapat paling tidak satu permatozoa yang bergerak aktif di mukus serviks (Kovacs et al, 1978) namun ada juga yang mengatakan bahwa PCT dianggap positif, kalau terdapat lebih dari 6 - 15 spermatozoa yang bergerak aktif dalam satu lapangan pandang dengan pembesaran mikroskup 45 kali.

Kalau PCT positif berarti : Dari fihak wanita faktor serviks baik dalam keadaan fase ovulasi, serta spermatozoa mampu bergerak baik dalam mukus serviks (penetrasi spermatozoa ke dalam mukus serviks baik)

Kalau PCT negatif, dengan pengertian segala metoda dan syarat-syarat untuk PCT telah dipenuhi, maka kemungkinannya ialah terdapat faktor non-imunologis dan imunologis.

* Terdapat faktor imunologis pada suami
* Terdapat faktor imunologis pada istri
* Terdapat faktor immunologis pada suami dan istri.
* Terdapat faktor-faktor non-imunologis pada istri dan suami.

Faktor non-imunologis misalnya keadaan azoospermia, oligozoospermia ekstrim, nekrozoospermia, dan kesalahan tehnik koitus. Dari fihak wanita misalnya adanya faktor infeksi, baik bakterial maupun protozoa dan gangguan ovarium.

Untuk memastikan tes SH positif atau negatif perlu dilaksanakan pemeriksaan berulang kali.

Tahap pertama ialah menyingkirkan faktor non-imunologis PCT, yaitu dengan mengadakan analisa sperma berulang kali, untuk melihat agglutinasi pada sperma segar. Atau dengan mengadakan ulangan PCT dengan menyingkirkan faktor-faktor lain misalnya infeksi-infeksi pada serviks maupun pada vagina, faktor ovarium dan lain-lain kemungkinan.

Menurut Kremer et al (1978) pasangan suami istri dengan fihak suami mempunyai antibodi terhadap spermatozoanya (autoimunitas), hasil PCT nya kebanyakan negatif atau lemah. Hal ini karena adanya spermatozoa yang teraglutinasi pada ejakulat, yang dapat dilihat pada sperma segar.

Pada ejakulat demikian diantara spermatozoa yang teraglutinasi terdapat spermatozoa aktif tetapi diselaputi oleh imobilisin, yang kalau bersentuhan dengan mukus servik akan menyebabkan kemunduran motilitas pada PCT, hal ini menghasilkan PCT negatif atau lemah. Keadaan ini terdapat terutama kalau mukus servik mengandung komplemen yang dapat memungkinkan terjadinya proses imobilisasi spermatozoa.

3. Tes Penetrasi Spermatozoa In Vitro (Sperm Penetration Test).

Tes ini dilaksanakan untuk menunjukkan kemampuan penetrasi spermatozoa ke dalam mukus servik in vitro.

Terdapat dua metoda untuk melaksanakan tes ini :

* Metoda kapiler.
* Metoda slide.

3.1. Tes Penetrasi spermatozoa metoda kapiler.

Metoda ini semula dikemukakan oleh Kremer (1965), dengan prinsip mengukur kemampuan spermatozoa untuk menerobos sekolom mukus servik dalam tabung kapiler. Metoda ini dilakukan pada minggu ke dua dari fase estrogenik, siklus menstruasi artifisial dengan pemberian pil.

Tes ini dapat dilaksanakan secara terpisah maupun berkaitan dengan tes SH.

Tes Penetrasi Spermatozoa-mukus Serviks berguna bilamana tes SH negatif atau lemah, walau kualitas/kuantitas sperma baik, keadaan mukus servik normal, dan waktu tes SH dilaksanakan tepat (Max Elstein, 1978).

Tes Penetrasi Spermatozoa metoda kapiler dilaksanakan dengan menggunakan sperm-penetration-meter yang terdiri dari lempeng gelas berkalibrasi (ukuran 25 x 75 cm), tempat (reservoar) sperma dan penyangga. Reservoar dibuat menyerupai potongan bawah tabung reaksi kecil, tertempel pada lempeng gelas, tempat sperma yang akan diperiksa.

Mukus serviks dihisap ke dalam tabung kapiler gelas, diameter 0,6 mm x 40 mm, kemudian tabung kapiler dicelupkan ke dalam sperma di dalam reservoar demikian rupa sehingga terjadi kontak antara sperma dengan mukus servik dapat terjadi dengan baik (tanpa ada gelembung udara). Bagian ujung yang lain dari kapiler ditutup dengan lilin.

Pemeriksaan dilaksanakan dengan meletakkan lempeng gelas berikut kapilernya horisontal.

Sperma yang dipakai tidak boleh lebih dari 3 jam setelah ejakulasi.

Karena pengambilan mukus servik tak selalu bertepatan dengan penampungan sperma, maka mukus servik yang diambil dapat disimpan terlebih dahulu dalam suhu 4° - 20°C, selama 3 minggu. Penilaian hasil tes dilakukan setelah 10 menit, 30 menit, 3 jam dan kalau mungkin setelah 24 jam.

1). Penetrasi linear spermatozoa.

Dilakukan seberapa jauh penetrasi spermatozoa ke dalam kolom mukus servik tersebut, yaitu dengan mengukur jarak yang dicapai oleh spermatozoa dalam waktu tertentu (cm).

2) Densitas penetrasi spermatozoa

Yaitu diukur jumlah spermatozoa pada daerah tertentu pada tempat penetrasi yang terjauh. Misalnya pada jarak 5 cm dalam satu lapangan pandang mikroskup pembesaran 10 x 10. Dalam hal ini harus dilihat seluruh ruang kapiler, bukan hanya pada dinding kapiler saja.

3) Motilitas spermatozoa.

Yaitu dengan mengukur motilitas baik spermatozoa pada sepertiga bagian atas kapiler dan dihitung sebagai berikut :

0 - Bilamana tak terdapat motilitas progresif (imotil/bergerak di tempat).
1 - Bilamana 25% dari spermatozoa mempunyai motilitas progresif.
2 - Bilamana 25 - 50 spermatozoa mempunyai motilitas progresif.
3 - Bilamana lebih dari 50% spermatozoa bermotilitas progresif.

Penilaian umum dari tes ini ialah sebagai berikut :

Score	0	1	2	3
* Penetrasi linear (cm)	0	0-2	2 - 5	5
* Densitas penetrasi	0	1-10	11- 50	50
* Motilitas pada 1/3 atas kapiler	0	1	2	3

Bilamana score maksimum mencapai 9 : Excellent
6 : good
3 : poor
3 : negatif

Tes penetrasi spermatozoa in vitro dianggap negatif, kalau dalam 2 jam tak terdapat spermatozoa yang bergerak progresif. Bilamana dalam dua jam tersebut terdapat spermatozoa yang bergerak progresif sejauh 5 cm, tes dianggap positif (Kremer, 1978).

Menurut Kremer, tidak semua pemeriksaan PCT positif, menunjukkan Tes Penetrasi Spermatozoa yang positif pula. Tetapi hasil Tes Penetrasi Spermatozoa in vitro berkorelasi dengan hasil SCMC. Hal ini disebabkan karena dalam PCT terdapat faktor-faktor yang non-imonologis yang berpengaruh dari pada faktor imunologis.

Jadi sebenarnya Tes Penetrasi Spermatozoa in vitro lebih sederhana dan lebih mendekati diagnostik imunologis dari pada PCT. Apalagi di dalam PCT, diantara peneliti belum terdapat kesepakatan tentang berapa banyak spermatozoa bergerak progresif yang dianggap PCT positif.

Tes penetrasi spermatozoa dapat digunakan untuk tes tambahan guna menentukan letak faktor yang menyebabkan % tes SH negatif. Apakah penyebabnya terletak pada fihak lelaki atau pada fihak wanita. Untuk maksud itu dapat dilaksanakan cross-match test dengan menggunakan mukus servik donor dan sperma donor pula, yang menggunakan pula empat tabung kapiler. (Olstein and Fjallbrant, 1976).

3.2. Tes Penetrasi spermatozoa metoda slide

Tes ini gunanya sama dengan tes penetrasi spermatozoa metoda kolom kapiler, tetapi yang dilakukan ialah dengan mengetahui seberapa jauh kemampuan spermatozoa menembus mukus serviks dalam suatu sediaan. Caranya ialah dengan meletakkan setetes mukus serviks, berdekatan dengan setetes sperma. Pada suatu saat keduanya akan bertemu, membentuk suatu perbatasan antara sperma dan mukus servik. Setelah terjadi pertemuan antara kedua permukaannya, lalu ditutup dengan gelas penutup.

Sediaan dilihat dibawah mikroskup, terutama pada antar permukaan (interface).

Dalam keadaan normal, sperma akan menerobos ke daerah mukus servik, membentuk gambaran seperti jari-jari(phalanges). Sebelum lebih lanjut menembus mukus servik, spermatozoa biasanya memenuhi ujung phalanges. Pada banyak hal spermatozoa tunggal mampu menerobos terlebih dahulu, memasuki daerah mukus serviks. Setelah spermatozoa pionir menerobos, spermatozoa berikutnya dengan mudah mengikuti masuk kedalam mukus serviks.

Tes ini pada mulanya dikembangkan oleh Miller dan Kurzrok (1932) dan juga oleh Barton dan Wiesner, (1946). Tes ini terkenal dengan Tes Miller Kurzrok. Tes ini ternyata kemudian dapat digunakan untuk membuktikan hipotesa tentang adanya agglutinasi spermatozoa yang tek tergantung pada komplemen dalam mukus serviks (Kremer,1978) ; Tes SCMC = Semen Cervical Mucus Contact).

Berbagai kemungkinan dapat terjadi, misalnya :

*) Spermatozoa dapat menemui hambatan, dengan berjalan berkelok-kelok secara acak.
*) Spermatozoa dapat berputar haluan, malah kembali ke daerah sperma.
*) Spermatozoa dapat melaju terus ke arah lebih dalam pada mukus serviks,untuk pada suatu saat menemui halangan berupa lekosit maupun sel-sel lepas trakus urogenital wanita.

Dengan landasan fakta ini dilakukan interpretasi hasil : tes penetrasi spermatozoa ke dalam mukus serviks dengan metoda slide.

Cara menghitung spermatozoa pada tes.

*) Yang dihitung adalah jumlah spermatozoa yang telah benar-benar memasuki mukus serviks.
*) Spermatozoa yang masih dalam daerah phalanges tidak dihitung.
*) Digunakan pembesaran mikroskup 200 atau 400 x.
*) Pemeriksaan dilakukan setelah 5 dan 15 menit setelah tes dimulai.
*) Dihitung spermatozoa dalam beberapa lapangan pandang, pada daerah interfase sperma-mukus serviks.
*) Dihitung milai rata-rata dari lapangan pandang (F1,F2,F3,F4 dst).

Interpretasi hasil tes.

* Dihitung nilai rata-rata spermatozoa pada beberapa lapangan pandang dekat "interface" dihasilkan nilai pada F1.
* Dihitung pula rata-rata spermatozoa pada beberapa lapangan pandang yang berada lebih jauh ke mukus serviks, dihasilkan nilai F2. Demikian seterusnya sampai terdapat beberapa nilai rata-rata pada F berikutnya.

Evaluasi hasil adalah sebagai berikut :

a) Excellent : F1 25 spermatozoa/lp ; F2 25 spermatozoa/lp.
b) Good : F1 15 spermatozoa/lp ; F2 15 spermatozoa/lp.
c) Poor : F1 5 spermatozoa/lp ; F2 5 spermatozoa/lp.
d) Negatif : Tak ada penetrasi spermatozoa pada F1 maupun F2.

4. Sperm Cervical Mucus Contact Test (SCMC-Test).

SCMC-Test dilakukan dengan menyentuhkan setetes sperma dengan mukus servik, karena adanya shaking phenomenon akibat imobilisasi spermatozoa di dalam mukus serviks yang dapat terjadi tanpa adanya komplemen.

Telah diterangkan bahwa untuk imobilisasi spermatozoa diperlukan komplemen. Tetapi ternyata bahwa proses imobilisasi dapat pula berlangsung tanpa adanya komplemen (Manarang-Pangan and Behrman, 1971 ; Kremer dan Jeger, 1976).

Oleh beberapa peneliti tersebut dilakukan percobaan dengan menghilangkan komplemen yang terjadi di mukus servik, tetapi masih terjadi imobilisasi spermatozoa juga. Imobilisasi itu terjadi demikian rupa sehingga setelah bersentuhan dengan mukus servik, spermatozoa hanya bergerak-gerak dengan ekor atau kepalanya saja yang bergetar. Gerakan ini oleh Kremer dan Jeger dinamakan shaking phenomenon. Sedangkan gerakannya dinamakan shaking movement.

Tes SCMC dilaksanakan berdasar hipotesa bahwa antibodi antispermatozoa yang terdapat pada spermatozoa maupun mukus servik dapat menyebabkan hubungan silang (cross linking) antara spermatozoa dan glikoprotein misel (micelles) yang membentuk anyaman glikoprotein pada mukus servik. Perlekatan spermatozoa pada anyaman glikoprotein menghasilkan terjadinya shaking movement atau jerking movement spermatozoa.

Terdapat dua macam hipotesa tentang penempelan spermatozoa pada anyaman glikoprotein.

Hasil dari Test Miller - Kurzrok dapat digunakan untuk menguji kebenaran hipotesa yang dikemukakan oleh Kremer.

Spermatozoa yang menempel pada mukus servik akan bergerak terbatas karena menempel pada glikoprotein.

Pertama : Yang melekat hanya ekor spermatozoa, kepala bergerak-gerak.

Kedua : Yang melekat hanya kepala, ekor bergerak-gerak.

Pada keadaan pertama antibodi terhadap spermatozoa terletak pada spermatozoa.

Pada yang kedua, antibodi terhadap spermatozoa terletak pada mukus serviks (Test Miller - Kurzrok).

Dengan fenomena ini, maka tes SCMC dapat digunakan untuk mendiagnosa apakah antibodi antispermatozoa terdapat pada spermatozoa atau pada mukus servik.

Metoda ini dapat dengan mudah dilakukan di laboratorium tanpa alat alat yang sophisticated, dapat pula dikerjakan secara rutin.

Untuk mengetahui dimana letak sebenarnya antibodi terhadap spermatozoa tes SCMC dilaksnakan dengan sistim Cross-Test. Cross-Test dilaksanakan dengan cara:

Kombinasi 1 : Sperma suami + mukus servik istri

Kombinasi 2 : Sperma suami + mukus servik donor.

Kombinasi 3 : Sperma donor + mukus servik istri

Kombinasi 4 : Sperma donor + mukus servik donor.

Penentuan hasil Tes SCMC ialah dengan mengadakan scoring :

Persentasi spermatozoa dengan shaking phenomenon di dalam kelompok spermatozoa yang aktif bergerak	Scoring
0 - 25 %	-
26 - 50 %	+
51 - 75 %	++
76 -100 %	+++

Dengan SCMC-Test dapat dipertunjukkan secara praktis adanya antiboli lokal yang secara langsung mempengaruhi kualitas spermatozoa untuk mengadakan penetrasi pada mukus servik.

Tes untuk menentukan macam, letak dan titer antibodi terhadap spermatozoa.

Terdapat beberapa macam antibodi di dalam serum yang dapat mempengaruhi spermatozoa. Antibodi itu ialah aglutinin yang menyebabkan spermatozoa beraglutinasi, imobilisin, yang menyebabkan spermatozoa tak bergerak, dan sitotoksin, yang menyebabkan spermatozoa mati.

Dengan tes-tes yang telah disebutkan di atas belum dapat ditentukan macam, letak dan titer antibodi dalam serum.

Untuk mengetahui hal ini diperlukan tes lainnya untuk dapat menentukan lebih lanjut keadaan infertilitas pasangan suami istri.

Tes imunologis tersebut dapat dikelompokkan menjadi beberapa macam :

1*. Tes aglutinasi
2*. Tes imobilisasi
3*. Tes Sitotoksisitas
4*. Tes imunofluoresensi.

Metoda pemeriksaan aglutinasi dan imobilisasi, sejak lama telah dipublikasi di berbagai Jurnal. Pada tahun 1974 di Denmark telah diadakan Workshop oleh WHO yang mendiskusikan masalah ini. Kemudian diputuskan membuat kesamaan terminologi untuk berbagai nama dari tes aglutinasi dan imobilisasi spermatozoa.

Di bawah ini adalah daftar nama lama dan baru untuk kedua macam tes tersebut.

Beberapa terminologi dan tehnik pemeriksaan imunologik sperma (Rose etal 1976 ; Dubin & Amelar, 1977 ; Jones, 1976).

	Nama lama	Nama Baru
I.	Tes Aglutinasi	
	1. Kibrick K - B - K	Gelatin Agglutination Tes(GAT)
	2. Franklin Dubes F & D F - D	Tube Slide Agglutination Tes (TSAT)
	3. Micro Agglutination Test (MAT)	Tray Agglutination Test (TAT)
	4. Capilary test	Capilary tube Agglutination Test(CTAT)
	5. Slide	Slide Agglutination Test(SAT)
II.	Immobilization Test	
	1. Isojima	Sperm Immobilisation Test(SIT-1)
	2. Fjallbrant	Sperm Immobilisation Test(SIT-F)
III.	Sperm Cytotoxic Antibodies Test(SCA) (Hamerlynk and Rumke,1968)	
IV.	Immonofluoresce test (Hansen, 1974).	

Berikut ini dijelaskan metoda-metoda tersebut di atas dengan terperinci.

1.1. Test Kibrick - GAT

Untuk mengetes serum, digunakan sperma dengan sperma counts lebih besar dari 60 juta.ml, dengan 50% motilitas baik. Spesimen ini dicampur dengan latutan bufer Baker (glukosa 30 mg ; Na_2HPO_4: S_2H_2O 6.0. g, Sodium Chioride 2.0 mg ; KH_2PO_4 0.1 gm air untuk membuat 1000 hl). Dengan campuran ini diharapkan jumlah spermatozoa : 40 juta.ml. Suspensi ini kemudian diencerkan lagi dengan gelatin 10% dengan larutan Baker pula.

Serum yang akan di tes dinaktifkan (56 °C, selama 30 menit, untuk menginaktifkan komplemennya.

Serum diencerkan dengan lar. Baker 1 : 4 dan 0.2 ml. ditambahkan ke 0.2 suspensi spermatozoa dalam gelatin. Dicampur, dikocok, kemudian dipindahkan tabung khusus dengan diameter 3 mm dengan panjang 3 cm. Kemudian diinkubasi pada 37 °C dan diperiksa pada intercal 1 dan 2 jam, pada latar belakang gelap dengan sinar kuat. Bila terdapat penggumpalan spermatozoa menunjukkan tes positif. Sera yang positif dengan pengenceran 1 : 40 terus diencerkan lagi sampai batas yang terkecil.

Dengan tes ini tidak saja diketahui ada atau tidak adanya antibodi terhadap spermatozoa (baik pada lelaki maupun wanita), tetapi juga diketahui titer atau aktifitas antibodinya.

1.2. Tes Franklin Dukes = TSAT.

Sperma segar yang digunakan ialah yang mempunyai 50% dengan motilitas baik. Spermatozoa diencerkan sampai mengandung 50 juta spermatozoa/ml (dengan larutan Baker).

0.05 ml sperma yang telah diencerkan dicampur dengan serum 0.05 ml yang diencerkan 1 : 40. Sebelumnya serum diinaktikan dengan pemanasan 56 ° selama 30 menit. Campuran ini kemudian diinkubasi pada 37 °C. Setelah 1/2, 1,2 dan 3 jam setetes campuran diperiksa di bawah mikroskup. Spermatozoa motil dihitung pada setiap 12 lapangan pandang pembesaran kuat. Dicat pula pada setiap lapangan pandang berapa jumlah penggumpalan dan macam penggumpalan apa yang terjadi.
Jumlah seluruh penggumpalan dibagi jumlah seluruh spermatozoa yang motil. Bilamana terdapat lebih dari 20% dari penggumpalan hasil tes dianggap positif. Bilamana terdapat tes positif, diadakan pengenceran guna melihat besar titer antibodi.

Tes ini harus dilakukan dengan ejakulat yang mengandung spermatozoa lebih besar dari 50 juta/ml.

Terdapat beberapa modifikasi dari Franklin Dukes tes.

Modifikasi dilakukan oleh (Shulman & Shulman, 1971 ; Shulman et al. 1973; Shulman, 1974.

Dihitung jumlah spermatozoa pada tiap 12 lapangan pandang dengan pembesaran kuat, yang mendapat jumlah kira-kira 100 sel ; dihitung jumlah sel yang bebas bergerak, dan dihitung jumlah sel dalam gumpalan-gumpalan. Yang diambil yang penggumpalan head - to - head, walaupun yang macam lain juga dihitung.

Jumlah penggumpalan dibagi dengan jumlah semua sel. Serum dianggap antibodi positif, bila terdapat angka 10%. Modifikasi ini perlu untuk menghindari adanya penggumpalan (aglutinasi palsu).

* Modifikasi lain ialah dari Boettceher et al. 1970 ; Boettcher & Kay, 1979). Modifikasi ini dinamakan F & D tehcnigue Sel spermatozoa dihitung sampai 100 buah yang motil bebas, dan diperiksa jumlah agglutinated clusters. Bilamana jumlahnya 6% atau lebih/100 sel serum dianggap positif dengan antibodi.

1.3. Micro Agglutination Test (=MAT)= Tray Agglutination Test (TAT)

Prosedur ini diajukan oleh Friberg (1974a) menggunakan microsyringes untuk mencampur serum dan spermatozoa pada daerah lempeng pemberiksa jaringan(tissue typing plate). Prosedure ini menghindarkan transfer dari tetesan bahan yang dites dari tabung inkubasi ke tempat slide observasi. Dan juga memungkinkan seseorang untuk memeriksa seluruh spesimen (campuran); lagi pula hal ini menghindarkan kesalahan yang mungkin terjadi pada tes F - D.

Tes ini kemudian menjadi populer, karena amat mudah untuk melihat pola agglutinasi spermatozoa.

Dengan cara ini dapat dilihat terjadi macam aglutinasi : H-H, T-T, atau TT-TT serta beberapa campuran dari macam tersebut.

Dengan cara ini tak dapat ditentukan antibodi.

1.4. Capilallary Test = CTAT

Berbeda dengan ke tiga tes terdahulu, dalam tes ini digunakan justru spermatozoa yang tak motil. Metode ini tak menguntungkan sebab tak dapat digunakan memeriksa autoantibodi.

1.5. Metode slide Slide Agglutination Test (=SAT)

Metode ini ialah kualitatif, dan dapat dilakukan sebagai pelengkap pda tes GAT.

Setetes serum dan setetes sperma dicampur, dan ditaruh di gelas obyek di lihat di mikroskop, setelah 15 - 30 menit. Dapat di lihat macam penggumpalannya.

II. 1. Tes Isojima = (SIT - 1).

Tes Isojima (1968 dan 1972) merupakan tes yang agak sederhana yang mengukur antibodi-tergantung-komplemen yang terdapat pada baik lelaki maupun wanita.

Bahan yang digunakan :sperma segar dengan sperm counts 80 juta/ml. dengan 50% motilitas progresif.

Sperma kemudian diencerkan sampai mengandung 60 juta spermatozoa/ml dengan larutan Bufer Baker.

Serum yang akan dites tak perlu diencerkan, diinaktikan pada temperatur 36 °C selama 30 menit, untuk menghilangkan komplemen di dalamnya.

Setelah itu di dalamnya diberikan komplemen (dari guinea pig atau rabbit).

*	Sera tes :	Serum manusia inaktif	0,250 ml
		Sperma segar (60 juta/ml.)	0.025 ml
		Komplemen	0.050 ml
*	Kontrol :	Serum manusia inaktif	0.250 ml
		Sperma manusia, segar (60 juta/ml)	0.025 ml

Campuran tersebut di atas diletakkan pada 10 tabung 10 x 75 mm dikocok, dan diinkubasi untuk 60 menit pada 37 °C. Kemudian motilitas spermatozoa pada serum tes dibandingkan dengan kontrol untuk serum yang sama, diukur SIV (Sperm Immobilitsation Value).

$$SIV = \frac{\text{Nilai motilitas (\%) spermatozoa pada serum kontrol}}{\text{Nilai motilitas (\%) spermatozoa pada resum tes.}}$$

SIV dinyatakan positif kalau lebih besar dari 2. Untuk mengetahui titer antibodi, serum yang dinyatakan positif tersebut diencerkan, misalnya: 1/2, 1/4, 1/8 dst.

Dalam hal ini untuk menghindari kesalahan, serum positif digunakan sebagai kontrol.

11.2 Tes Fjallbrant = SIT - F

Tes ini dikemukakan Fjallbrant pada tahun 1965, yang pada prinsipnya sama dengan tes Isojima, tetapi yang diukur adalah waktu yang diperlukan untuk campuran tes guna menunjukkan berkurangnya motilitas sampai sepersepuluh dari motilitas kontrol.

Bilamana waktu yang digunakan lebih pendek, campuran itu dikatakan positif. Tes ini masih perlu diuji lagi dengan mengadakan korelasi dengan lain test.

Menentukan Sperm Cytoxic Antibodies. (SCA) metoda Hamerlynk & Rumke.

Untuk menentukan efek sitotksin pada spermatozoa zat warna ditambahkan, yaitu tryptan blue, untuk mengecat spermatozoa sel mati. Jumlah sel yang tercat (mati) dihitung. (Hamerlynk & Rumke, 1968).

Seperti halnya imobilisin, sitotoksin juga tergantung pada komplemen.

Aktifitas sitoksin adalah adanya efek lisis pada akrosom spermatozoa dan spermatid, akrosoma membengkak.

Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskup fase kontras.

Spermatozoa yang ter-cat	score
0 - 25 %	0
26 - 50 %	1
51 - 75 %	2
76 -100 %	3

Beberapa peneliti memasukkan imobilisasi dan sitotoksin menjadi satu kelompok antibodi.

Pemeriksaan imunologis dengan metode imunofluoresensi

Antigen pada spermatozoa tidak terdapat pada membran sel saja, tetapi juga terdapat di bawah membran sel (Hansen, 1974). Berbagai metode pemeriksaan imunologis yang telah diterangkan di atas meliputi ke-antigen-an yang terdapat pada membran sel. Tetapi dengan pemeriksaan imunofluoresensi, antigen yang terdapat di bawah membran sel dapat diperiksa.

Dengan metode imunofluoresensi, dapat diperiksa dimana antibodi akan bereaksi dengan antigen. Dengan tehnik ini pula dapat dicari tempat antigen di bawah membran sel. Fiksasi dengan metonol absolut pada sperma yang telah disentrifugasi akan mengubah keadaan membran sel dan menyebabkan antigen dapat dicapai oleh antibodi. Kalau antibodi tertentu di "labelled" dengan zat fluoresensi diikutkan pada reaksi pemeriksaan ini, maka letak antibodi tersebut dapat dilacak menempelnya pada spermatozoa. Cara penentuan letak antigen atau antibodi ini adalah indirek.

Caranya dilakukan dengan membuat sediaan hapusan sperma yang telah disentrifugasi, dikeringkan, dan difiksasi dengan metanol absolut dibiarkan sampai kering. Setelah itu di daerah tertentu ditutup dengan sampel serum, diinkubasi pada temperatur kamar selama 30 - 60 menit, kemudian dicuci dengan larutan buffer.

Setelah itu sediaan diinkubasi dengan antibodi tertentu yang di-"labelled" fluorencein isothyocyanate (FITC) conjungated antisera terhadap imunoglobulin manusia, untuk 30 menit.

Setelah dicuci dan dikeringkan, sediaan dilihat di bawah mikroskup fluoresensi .

Medode ini dipakai banyak peneliti, dan akhirnya dapat untuk menentukan adanya antigen di bawah membran plasma yang letaknya berbeda beda, misalnya : anterior akrosom, leher, bag-tengah ujung ekor. Karena letak antigen yang berbeda beda itulah yang menyebabkan terjadinya berbagai macam aglutinasi spermatozoa.

KEPUSTAKAAN

* Barton, M. and Wiesner, B.P.(1946) The receptivity of cervical mucus to spermatozoa. ; Brit. Med. J.2 : 606.
* Cohen, J and Greson, S.H. (1978). Antibodies and sperm survival in the female genital tract. In : Spermatozoa, Antibodies and Infertility. Eds. Cohen, J.and Hendry, W.F. Elacsell Scientific Publication, Offord.
* Elstein, Max. (1978) The Role of Cervical Mucus in physiology of sperm transportaion and its clinical assessment. In : Spermatozoa, Antibody and Infertility. Eds. : Jack Cogen and Hendry. W.F.; Blackwell Scientific Publications. Oxford.
* Franklin, R.R. and Dukes, C.D. (1964) Antispermatozoal antibody and un explained infertility. Amer. J. Obstet. Gynec. 89.6-9.
* Glass, R.H. and Vaidya, R.A. (1970). Sperm agglutinating antibodies in infertile women. Fertil. Steril 21, 657 - 661.
* Hanafiah, M.H. Epstein, J.A. and Sobreto, A.J. (1972) Sperm agglutinating antibodies in 236 infertile couples. Fertil. Steril 23, 493-497.
* Hellinga, G. (1976). Clinical Andrology, William Heinemann Medical Books Ltd. London.
* Hendy WF, Morgan H. Stedronska, J. (1973). The Clinical of antigen antibody in male infertility. J.of Urol : 119 (2), 231-234.
* Jones, W.R. (1976). Immunological aspect of infertility. In : Immunology of Human Reproduction. Eds. : Scott, J.S. and Jones W.R. Asademic Press Kondon; Grunne & Stratton, New York.
* Jones WR. (1980) Immunological factors in male and female infertility In : Hearn JP. ed. Immunological aspects of reproduction and fertility controle. Bal timore, Maryland, University Park Press, 105-140.
* Koentjoro Soehadi dan K.M.Arsyad (1981). Korelasi antara aglutinasi spermatozoa dan berbagai parameter sperma pada sekelompok lelaki fertil. Naskah belum dipublikasi.
* Kremar J.S. Jager. J. Kuiken and Tiny van Slochteren Draaisma (1978). Recent advances in diagnosis anf treatmant of infertility due to antisperm antibodies. Spermatozoa, Antibodies and Infertility. Black well Scientific Publications, Ogford.

* Kovacs, GT., Newman, G.B. and Henson, GL. (1978). The Post Coital Test : What is normal ? Brit.Med.J.1,4,818.

* Kremer, J.(1965). A simple sperm penetration test. Int.J.Fertil.10:209

* Kremer J.and Jager, S. (1976) The sperm servical mucus contact test : a preliminary report. Ferti. Steril, 27, 335 - 340.

* Meaker, S.R. (1922). Some aspects of the problem of sterility.Sost Med. Surg. J. 187, 535 - 537.

* Miller, B., and Kurzrov, R. (1932) Biokhemical studies of Human Semen. III. Factors affecting migration of sperm through the cervix; Am. J. Obstet Gynecol. 24: 19.

* Manarang Pangan S. and Behrman, B.J. (1971). Spermatoxicity of immune sera in human infertility. Fertil. Steril. 22 : 145-151.

* Menge, A.C. and Behrman, S.J. (1979). Immunologic Infertility. Clin, Obs. Gynec.22.1.

* Rumke, P. (1974). The origin of immunoglubulin in semen. Clin. Exp. Immunol. 17, 187 - 297.

* Rumke, P. and Hellinga, G. (1959). Autoantibodies aginst spermatozoa in sterile men. Amer.J.Clin.Path. 32,357 - 363

* Rose, NR,Ajort, T., Rumke, P. Harper, M.J.K.and Vyazov.O. (1976). Technique for detection of iso and autoantibodies to Human spermatozoa. Clin. & Exp. Immunol. 23 : 175 - 199.

* Schumacher GF.(1979). Immonologic factors in infertility antibodies against spermatozoa. Journal of Reproductiove Medicine,23(6) 272-278.

* Ulstein, M., and Fjallbrant, B.B.(1976). In vitro Test of sperm penetration in cervical mucus. In : Human Semen and Fertility Regulation in men. Eds: A.E.S.E.Hafez. The C.V.MO Sby Company,Saint Louis.

* WHO (1980). Laboratory Manual on examination of Human Semen and Semen cervical mucus interaction, Singapura.

* Waldman, R.H. Cruz. J.M.and Rowe. D.S.(1972). Sperm migration, inhibitin antibody in human cervico-vaginal secretions. Clin. Exp.Immunol 12: 49 - 54.
