

TESIS

**PERBANDINGAN METODE SIMPAN BEKU KONVENSIONAL
DENGAN VITRIFIKASI PADA SPERMA PRIA
NORMOZOOSPERMIA TERHADAP MORFOLOGI,
MOTILITAS, VIABILITAS DAN KONDENSASI KROMATIN
SPERMATOZOA**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



**MIRA NOVIA
NIM 099913332 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA
2003**

**PERBANDINGAN METODE SIMPAN BEKU KONVENSIONAL
DENGAN VITRIFIKASI PADA SPERMA PRIA
NORMOZOOSPERMIA TERHADAP MORFOLOGI,
MOTILITAS, VIABILITAS DAN KONDENSASI KROMATIN
SPERMATOZOA**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :
MIRA NOVIA
NIM 099913332 M**

**Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Pascasarjana
Universitas Airlangga Surabaya
Tahun 2003**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 28 Juli 2003

Oleh

Pembimbing Ketua



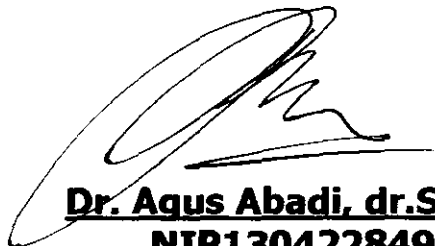
Prof.Dr.H. Soehartojo Hardjopranjoto, MSc.Drh.
NIP.130189851

Pembimbing



dr. Aucky Hinting, Ph.D
NIP. 130873509

Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Agus Abadi, dr.SpOG
NIP130422849

Ucapan Terima Kasih

Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas segala rahmat, hidayah, dan karunia tak terhingga yang telah dilimpahkan kepada saya, sehingga penelitian dan penulisan tesis ini dapat diselesaikan.

Dengan penuh rasa hormat, saya menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. DR. H. Soehartojo Hardjopranjoto, MSc. Drh. selaku pembimbing ketua atas bimbingan, arahan dan saran sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Juga kepada dr. Aucky Hinting, Ph.D. selaku pembimbing atas bimbingan, arahan dan saran serta bantuannya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian ini, khususnya atas fasilitas di Laboratorium Fertilisasi *in-vitro* Rumah Sakit Dr. Soetomo, Surabaya.

Pada kesempatan ini ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada yang terhormat Rektor Universitas Airlangga, Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi beserta seluruh staf pengajar Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister di Universitas Airlangga. Juga kepada Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta staf dan karyawannya atas segala fasilitas dan bantuan yang diberikan selama saya menempuh pendidikan.

Tidak lupa ucapan terima kasih ini juga saya sampaikan kepada Direktur Rumah Sakit Dr. Soetomo, Surabaya dan kepala UPF Andrologi Rumah Sakit Dr. Soetomo, Surabaya atas ijin dan fasilitas yang diberikan

sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan. Dan juga kepada penguji proposal dan tesis yaitu Cholil Munif dr. AIF, Mas'ud Hariadi, Drh. M.Phill., Ph.D, Dr. dr. Rina Yudiwati MS. Juga kepada seluruh staf Laboratorium Fertilisasi *in-vitro* dan UPF Andrologi Rumah Sakit Dr. Soetomo, Surabaya atas bantuan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah membantu saya selama ini.

RINGKASAN

ABSTRAK: Perbandingan metode simpan beku konvensional dengan vitrifikasi pada sperma pria normozoospermia terhadap morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa (dibawah bimbingan Prof. DR. H. Soehartojo Hardjopranjoto, Drh., MSc. Dan dr. Aucky Hinting, Ph.D).

Metode vitrifikasi merupakan alternatif kriopreservasi spermatozoa yang terus diteliti dan dikembangkan karena tekniknya lebih efisien, murah, sederhana dan mudah dilakukan bila dibandingkan dengan metode konvensional. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat keberhasilan metode vitrifikasi, serta mengetahui kualitas spermatozoa setelah vitrifikasi, agar dapat digunakan sebagai model pilihan untuk simpan beku spermatozoa khususnya bagi kepentingan ART (*Assisted Reproductive Techniques*).

Penelitian ini menggunakan krioprotektan Glycerol 15 % + HEPES + Human Serum Albumin (*Medium freeze, Fertipro, Belgia*). Sampel yang digunakan adalah sperma pria normozoospermia. Sebanyak 10 ejakulat dilakukan 3 macam perlakuan. Perlakuan pertama dilakukan pemeriksaan sebelum kriopreservasi, dan pada dua kelompok lainnya masing-masing ditempatkan pada *ministraw* 0,25 ml kemudian dilakukan simpan beku dengan metode konvensional dan vitrifikasi. Setelah dibekukan selama 24 jam, dilakukan *thawing* atau pencairan kembali, kemudian dilakukan pewarnaan dan diamati dibawah mikroskop. Parameter yang diukur adalah morfologi normal, motilitas (a+b), viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase Morfologi normal spermatozoa pada metode konvensional $18,2 \pm 3,33$ %, dan pada vitrifikasi $18,0 \pm 2,98$ %. Motilitas spermatozoa pada konvensional $29,3 \pm 12,26$ %, dan pada vitrifikasi $28,8 \pm 11,31$ %. Viabilitas spermatozoa pada metode konvensional adalah $36,7 \pm 11,04$ %, pada vitrifikasi adalah $33,1 \pm 12,55$ %. Sedangkan Kondensasi kromatin pada konvensional $72,4 \pm 5,32$ %, dan pada vitrifikasi $75,75 \pm 9,11$ %. Setelah diuji analisa dengan uji Manova, hasil yang diperoleh adalah tidak ada perbedaan bermakna antara metode konvensional dan vitrifikasi pada masing-masing variabel.

ABSTRACT

"Comparative study between conventional and vitrification methods on man with normozoospermic sperm towards morphology, motility, viability and chromatin condensation of spermatozoa". (under guidance of Prof. DR. H. Soehartojo Hardjopranjoto, Drh., MSc. and dr. Aucky Hinting Ph.D.).

Vitrification method is an alternative for cryopreservation of spermatozoa which is continuously studied and developed because the technique is more efficient, cheaper, simpler and easily carried out, compared to the conventional method. The purpose of this study is to observe the results of the vitrification as well as to examine the quality of spermatozoa after vitrification, so that it can be used as a model for cryopreservation of sperm especially for the ART (Assisted Reproductive Techniques).

The study applies cryoprotectants glycerol 15% + HEPES + Human Serum Albumin (Medium Freeze, Fertipro, Belgi). The sample is normozoospermic sperm - 10 ejaculates treated in three ways. The first is observed before cryopreservation, and the other two groups are put in mini straw 0,25 ml., then preserved in frozen condition using conventional and vitrification methods. After being frozen for 24 hours, the sperm are thawed, then stained and observed under microscope. The parameter is the percentage of normal morphology, motility (a+b), viability and chromatin condensation of spermatozoa.

The study shows that the average percentage of normal morphology in conventional method is $18,2 \pm 3,33 \%$, while in vitrification $18,0 \pm 2,98 \%$; The motility of spermatozoa in conventional is $29,3 \pm 12,26 \%$, and in vitrification $28,8 \pm 11,31 \%$; the viability of spermatozoa in conventional is $36,7 \pm 11,04 \%$, and vitrification $33,1 \pm 12,55 \%$; the chromatin condensation in conventional is $72,4 \pm 5,32 \%$, and in vitrification $75,75 \pm 9,11 \%$. After being examined with Manova test, this proves that, at each variable, there is no significant difference between conventional and vitrification methods.

DAFTAR ISI

	Halaman
Daftar Isi	i
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vii
Daftar Lampiran	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Spermatozoa	6
2.1.1. Spermatogenesis	6
2.1.2. Morfologi Spermatozoa	7
2.1.3. Seminal Plasma	9
2.1.4. Motilitas Spermatozoa	10

2.1.5. Kondensasi kromatin	12
2.2. Kriopreservasi	13
2.3. Vitrifikasi	16
2.4. Krioprotektan	19
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	 22
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	22
3.2. Hipotesis Penelitian	26
 BAB 4 METODE PENELITIAN	 27
4.1. Rancangan Penelitian	27
4.1.1. Jenis Penelitian	27
4.1.2. Rancangan Penelitian	27
4.2. Tempat Dan Waktu Penelitian	27
4.3. Populasi, Sampel, Dan Besar Sampel	27
4.3.1. Populasi Penelitian	27
4.3.2. Sampel Dan Besar Sampel	28
4.4. Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional Variabel	29
4.4.1. Variabel Penelitian	29
4.4.1.1. Variabel Tergantung	29
4.4.1.2. Variabel Bebas	29
4.4.1.3. Variabel Kendali	29

4.4.2. Definisi Operasional Variabel	29
4.5. Materi Dan Bahan Penelitian	31
4.5.1. Subyek Penelitian	31
4.5.2. Bahan Dan Alat Penelitian	32
4.5.2.1. Bahan Penelitian	32
4.5.2.2. Alat Penelitian	32
4.6. Pelaksanaan Penelitian	32
4.6.1. Metode Simpan Beku Konvensional	32
4.6.2. Metode Pencairan Konvensional	33
4.6.3. Pelaksanaan Vitrifikasi	34
4.6.4. Metode Pencairan Vitrifikasi	34
4.6.5. Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa	34
4.6.6. Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa	35
4.6.7. Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa	36
4.6.8. Pemeriksaan Kondensasi Kromatin Spermatozoa	36
4.7. Analisa Data	37
 BAB 5 ANALISI HASIL PENELITIAN	 38
5.1. Hasil Uji Coba Penelitian	38
5.2. Hasil Penelitian	44
 BAB 6 PEMBAHASAN	 51

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	61
7.1. Kesimpulan	61
7.2. Saran	62
 DAFTAR PUSTAKA	63
 LAMPIRAN	69

DAFTAR TABEL**Halaman**

Tabel 5.1.1. Persentase morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin dengan menggunakan krioprotektan EG + Sucrose + HSA dengan konsentrasi yang berbeda pada metode Vitrifikasi.	38
Tabel 5.1.2. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 40% + Sucrose 0,3 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda	39
Tabel 5.1.3. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 40% + Sucrose 0,2 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda	39
Tabel 5.1.4. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 40% + Sucrose 0,1 M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	39
Tabel 5.1.5. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 30% + Sucrose 0,3 M + HAS 6% pada penurunan suhu berbeda	40
Tabel 5.1.6. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 30% + Sucrose 0,2 M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	40
Tabel 5.1.7. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 30% + Sucrose 0,1 M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	40
Tabel 5.1.8. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 20% + Sucrose 0,3 M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	41
Tabel 5.1.9. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 20% + Sucrose 0,2 M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	41

Tabel 5.1.10. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 20% + Sucrose 0,1 M + HSA 6% dengan penurunan suhu berbeda	41
Tabel 5.1.11. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 10% + Sucrose 0,3 M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	42
Tabel 5.1.12. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 10% + Sucrose 0,2, M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	42
Tabel 5.1.13. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 10% + Sucrose 0,1 M + HSA 6% pada penurunan suhu berbeda	42
Tabel 5.1.14. Persentase morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa setelah dikriopreservasi dengan metode konvensional dan vitrifikasi dengan menggunakan medium <i>Freeze</i> (Fertipro, belgia) serta vitrifikasi tanpa krioprotektan	43
Tabel 5.2.1. Uji Manova kualitas spermatozoa antar kelompok	48
Tabel 5.2.2. Uji Komparasi Ganda L SD kualitas spermatozoa antar kelompok	49
Tabel 5.2.3. Penurunan kualitas spermatozoa yang telah dikriopreservasi baik dengan metode konvensional maupun dengan metode vitrifikasi	50

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.2.1. Diagram Bar viabilitas spermatozoa sebelum dan setelah dikriopreservasi dengan metode konvensional dan vitrifikasi	44
Gambar 5.2.2. Diagram Bar morfologi spermatozoa sebelum dan setelah dikriopreservasi dengan metode konvensional dan vitrifikasi	45
Gambar 5.2.3. Diagram Bar motilitas spermatozoa sebelum dan setelah dikriopreservasi dengan metode konvensional dan vitrifikasi	46
Gambar 5.2.4. Diagram Bar kondensasi kromatin sebelum dan setelah dikriopreservasi dengan metode konvensional dan vitrifikasi	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data hasil pemeriksaan morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa manusia pada pemeriksaan awal, setelah disimpan beku dengan metode konvensional dan vitrifikasi dengan menggunakan medium <i>freeze</i> (Fertipro, Belgia)	69
Lampiran 2. Data hasil simpan beku spermatozoa dengan metode konvensional menggunakan medium <i>freeze</i> Fertipro dan sedangkan metode vitrifikasi menggunakan krioprotektan EG dengan konsentrasi berbeda dan penurunan suhu berbeda	71
Lampiran 3. Data hasil pemeriksaan morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa manusia pada pemeriksaan awal, setelah simpan beku dengan metode vitrikasi yang menggunakan krioprotektan yang telah dikemas dalam medium <i>freeze</i> (Fertipro, Belgia) dan vitrifikasi tanpa krioprotektan	76
Lampiran 4. Rerata nilai morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa manusia sebelum dan sesudah dikriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi	77
Lampiran 5. Tes Kenormalan Distribusi pada kelompok Awal (sebelum dilakukan kriopreservasi)	77
Lampiran 6. Tes Kenormalan Distribusi pada kelompok konvensional	78
Lampiran 7. Tes kenormalan Distribusi pada kelompok vitrifikasi ...	78
Lampiran 8. Statistik Deskriptif dan Univariate Analysis pada morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa sebelum dan sesudah kriopreservasi dengan metode konvensional dan vitrifikasi	79

Lampiran 9. Medium kriopreservasi dengan metode konvensional dan vitrifikasi / krioprotektan	83
---	-----------

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang Masalah

Proses simpan beku sperma (kriopreservasi) adalah suatu prosedur penyimpanan sperma pada suhu rendah (-196°C) dalam nitrogen cair dengan dicampur krioprotektan sebelum dilakukan penyimpanan. Dalam bidang reproduksi manusia, lingkup penggunaan simpan beku sperma antara lain sebagai langkah profilaksis pada tindakan medis yang memungkinkan terjadinya penurunan kuantitas dan kualitas sperma. Seperti misalnya pada kasus pasangan yang mempunyai masalah fertilitas, pengobatan keganasan penyakit yang dilakukan dengan penggunaan kemoterapi, atau tindakan pengamanan sebelum dilakukan vasektomi karena kemungkinan terjadinya antibodi-antisperma (ASA) *post* vasektomi yang dampaknya mengganggu kesuburan. Manfaat lain yaitu sebagai sarana pendukung laboratorium tehnik bantu reproduksi (*Assisted Reproductive Techniques* - ART) (Kliesch *et al*, 1997; Zavos *et al*, 1995; Donnelly *et al*, 2001) .

Menurut Grizard *et al* (1999) dan Hammadeh (1999) sperma yang dapat dipergunakan untuk simpan beku adalah sperma normal dan subnormal, yang dapat berasal dari ejakulat maupun dari epididimis bahkan testis (Polcz *et al*, 1996; Devroey *et al*, 1995; Allahbadia, 2002), dimana sperma yang dipergunakan dapat dalam keadaan segar (*fresh semen*) atau sperma yang telah mengalami pencucian (*washed semen*)

(Marshburn *et al*, 1992; Kolb & Jeyendran, 1997; Veryehen *et al*, 1993; Zavos *et al*, 1998; Winarso & Hinting, 1999).

Teknik simpan beku dengan metode kriopreservasi dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu *slow freezing*, *rapid freezing* atau *ultra rapid freezing*, dimana pada proses pembekuan tersebut dilakukan penurunan suhu bertahap secara lambat maupun cepat.

→ Keberhasilan proses simpan beku sehingga mendapatkan hasil yang optimal ditentukan oleh banyak faktor antara lain laju penurunan suhu pada saat pembekuan, proses pencairan (*thawing*) salah satu tahap pasca proses simpan beku dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan. Pada proses pembekuan (*freezing*), cairan intraseluler yang terdapat pada sel akan membentuk kristal es, dimana hal ini harus dihindari dengan cara membuat keadaan dehidrasi pada sel, agar tidak mengganggu viabilitas sel selama proses tersebut. Krioprotektan dalam proses ini mempunyai peranan untuk menjaga ketahanan hidup sel dari kerusakan yang dapat terjadi akibat kristal es tersebut (Wetzel, 1996).

Telah banyak penelitian yang dilakukan mengenai simpan beku dengan mempergunakan metode kriopreservasi konvensional. Pada tahun terakhir yang banyak mendapat perhatian adalah simpan beku dengan metode vitrifikasi. Teknik vitrifikasi ini jauh lebih sederhana dan lebih efisien, karena waktu yang diperlukan lebih singkat dan tidak membutuhkan peralatan yang mahal. Metode vitrifikasi ini telah dipergunakan untuk simpan beku embrio, oosit, organ tubuh bahkan jaringan dengan hasil yang cukup sukses. Dengan demikian simpan

beku dengan vitrifikasi dapat dijadikan suatu alternatif dalam simpan beku sperma.

Pada metode vitrifikasi, teknik pelaksanaannya adalah material yang akan dibekukan diletakkan pada media hiperosmolaritas dan kemudian langsung dibenamkan ke dalam nitrogen cair (-196°C) sehingga larutan yang membeku seolah-olah menjadi seperti kaca dan tidak sampai terjadi proses kristalisasi (Supriatna & Pasaribu, 1992; Wetzel, 1996; Quinn, 1995).

Masalah utama pada metode vitrifikasi adalah penurunan suhu yang secara tiba-tiba pada suhu -196°C , dimana hal ini dapat mengakibatkan kemampuan hidup sel terganggu karena ketidakmampuan sel tersebut untuk mengeluarkan air (dehidrasi) dengan kecepatan tertentu dan tidak dapat mempertahankan keseimbangan kimiawi dengan cairan ekstraselulernya (Quinn, 1995). Penurunan suhu akan mengakibatkan terganggunya kemampuan hidup sel yang akan mempengaruhi morfologi, motilitas dan integritas DNA-nya disamping juga merusak kemampuan fertilisasi sperma (Allahbadia, 2002). Keadaan tersebut diatas dapat dikurangi dengan penggunaan krioprotektan. Oleh karena itu, krioprotektan yang digunakan harus tepat yaitu dengan konsentrasi tinggi dan mempunyai efek toksik yang rendah terhadap sel. Selain itu, pada proses pencairan kembali (*thawing*) yang baik untuk vitrifikasi adalah dengan penghangatan yang cepat agar larutan yang terbentuk seperti kaca tersebut berubah

tersebut berubah langsung menjadi cair sehingga dapat menghindari pembentukan kristal es yang dapat merusak sel.

Pada penelitian vitrifikasi oosit yang telah dilakukan Trouson *et al*/ pada tahun 1999, dengan mempergunakan krioprotektan yang memiliki toksisitas rendah misalnya ethylene glycol, sucrose, dan serum albumin manusia (*Human Serum Albumin* – HSA), hasil yang didapatkan dengan sejumlah kecil oosit yang telah dicairkan terdapat 67% dalam keadaan baik dan mampu bertahan hidup, dan 80% oosit fertil yang bertahan dan terbentuk 6-10 sel embrio pada hari ketiga. Terjadi satu kehamilan pada tiga embrio yang terbentuk yang ditransferkan pada ibu pasangan infertil.

Metode vitrifikasi pada spermatozoa manusia perlu diteliti karena spermatozoa adalah salah satu awal dari pembentukan manusia baru. Awal yang tidak baik akan menghasilkan produk yang tidak baik pula. Berlandaskan uraian tersebut diatas maka simpan beku spermatozoa manusia dengan metode vitrifikasi perlu diperbandingkan hasilnya dengan metode konvensional dengan melihat kemampuan hidup sperma dan ada tidaknya perubahan morfologi, motilitas maupun kondensasi kromatinnya untuk kepentingan penggunaan sperma khususnya pada teknik bantu reproduksi (*Assisted Reproductive Techniques*). Metode vitrifikasi ini hasilnya diharapkan lebih menguntungkan dibandingkan dengan metode konvensional.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah hasil metode vitrifikasi lebih tinggi dibandingkan dengan metode simpan beku konvensional ditinjau dari viabilitas, morfologi, motilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa manusia.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil simpan beku spermatozoa dengan metode vitrifikasi pria normozoospermia dibandingkan dengan metode simpan beku konvensional.

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk membuktikan adanya perbedaan viabilitas, morfologi, motilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa manusia setelah dilakukan metode simpan beku konvensional dan metode vitrifikasi

1.4. Manfaat Penelitian

Bila tingkat keberhasilan simpan beku sperma manusia dengan metode vitrifikasi lebih baik dibandingkan dengan metode konvensional, diharapkan dapat dikembangkan simpan beku sperma dengan teknik yang praktis dan efisien sebagai alternatif penyediaan sperma. Selain itu, hasil dari penelitian ini diharapkan juga untuk dijadikan sebagai salah satu model penyediaan dan penyimpanan sperma khususnya bagi kepentingan laboratorium teknik bantu reproduksi (*Assisted Reproductive Tehniques* - ART).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Spermatozoa

Semen atau ejakulat manusia terdiri dari dua komponen yaitu spermatozoa dan plasma sperma. Spermatozoa diproduksi di tubulus seminiferus di dalam testis melalui proses yang rumit dan lambat, proses ini disebut spermatogenesis (Barratt, 1995). Dalam epididimis spermatozoa akan mengalami pematangan dan perubahan seluler, juga merupakan tempat penyimpanan spermatozoa sebelum dikeluarkan (Moore, 1995). Proses spermatogenesis membutuhkan waktu berminggu-minggu mulai dari pembentukan awal sampai dengan membuatnya siap untuk proses ejakulasi.

2.1.1 Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan proses perubahan sel yang paling muda (spermatogonia) sampai menjadi sel yang paling dewasa (spermatozoa). Lamanya proses spermatogenesis pada manusia lebih kurang 70 hari (Keer, 1992). Dalam proses spermatogenesis, perubahan spermatogonia mejadi spermatozoa terbagi dalam beberapa tahap yaitu 1) Replikasi spermatogonia, 2) pembelahan reduksi atau meosis, 3) Spermiogenesis. Tahap pertama spermatogonia mengalami mitosis dan berubah menjadi sel-sel spermatosit primer. Pada tahap kedua terjadi proses meosis.

Meosis I, sel spermatosit primer yang mempunyai kromosom diploid membelah menjadi 2 spermatosit sekunder yang mempunyai kromosom haploid. Kemudian disusul dengan pembelahan meosis II dimana sel spermatosit sekunder membelah diri menjadi spermatid yang juga bersifat haploid jumlah kromosomnya. Pada tahap ketiga yang diawali terbentuknya spermatid tersebut, disusul dengan terjadinya proses metamorphosis seluler dimana spermatid yang berbentuk bulat berubah menjadi spermatozoa yang mempunyai inti kecil lonjong dan padat, sitoplasmanya minim sekali dan mempunyai ekor yang dapat bergerak aktif. Proses perubahan ini disebut spermiogenesis. Setelah itu spermatozoa akan keluar dari tubulus seminiferus menuju epididimis dan mengalami pematangannya di epididimis (Barrat, 1995; Hafes, 1980).

2.1.2. Morfologi Spermatozoa

Secara morfologi spermatozoa dibagi atas kepala (*head*), leher (*connecting piece*), *midpiece*, *principal piece* dan *terminal piece*.

Kepala spermatozoa berukuran $4,5\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ dengan bentuk pleomorphic, mengandung nukleus atau inti spermatozoa yang berfungsi untuk mengisi dan memelihara DNA yang akan dilepas pada saat fertilisasi bersama sel telur. Kepala spermatozoa berisi berbagai macam struktur dengan fungsinya masing-masing. Antara lain akrosom yang merupakan terminal body yang berfungsi melindungi nukleus, dan terdapatnya enzim-enzim pada akrosom yang dipergunakan pada saat penetrasi ovum ketika proses fertilisasi, selain itu juga mengandung inti yang berisi kromosom haploid.

Kromatin inti terdiri dari kromatin padat di dalam DNA inaktif yang dikemas dengan protamin yang kaya arginin dan cysteine. Sifat dasar protamin adalah menetralkan isi dari kekuatan ester phosphat dalam DNA dan untuk menjaga kromatin tetap dalam kesatuan. Sedangkan cysteine berfungsi untuk menjaga nukleus tetap stabil mulai awal spermiogenesis sampai di epididimis (Curry *and* Watson, 1995). Bagian anterior kepala spermatozoa mempunyai banyak lapisan membran, yaitu dari luar ke dalam mulai dari membran plasma, membran akrosom bagian luar, membran akrosom bagian dalam dan akhirnya membran nukleus. Membran sel merupakan struktur yang amat kompleks dalam susunan mozaik yang teratur dan memiliki peran biologik spesifik pada permukaan sel. Hampir semua membran sel mengandung beberapa enzim yang sebagian bekerja diluar membran dan sebagian bekerja didalam kompartemen yang terbungkus membran. Komposisi membran sel berasal dari ratusan jenis protein bahkan ribuan jenis lipid atau molekul yang berbeda yang digabung bersama-sama oleh beberapa interaksi nonkovalen yang sangat sensitif terhadap faktor-faktor ekstrinsik seperti suhu, kekuatan ionik dan polaritas pelarut (Nolan *and* Hammerstedt, 1997).

Connecting piece atau leher spermatozoa adalah sebagai penghubung antara kepala dengan ekor, dengan ukuran 0,5 μm . Fungsinya agar spermatozoa dapat bergerak dengan bebas tanpa adanya tekanan antara capitulum dan basal plate (Curry *and* Watson, 1995).

Ekor (Flagelum) terdiri dari midpiece, principle piece dan terminal piece. Midpiece panjangnya 3,5 μm , merupakan segmen dengan lapisan mitokhondria yang tersusun secara heliks, bagian luarnya dibungkus oleh lapisan disulfid dan pada bagian dalam mitokhondria merupakan daerah produksi energi untuk pergerakan spermatozoa dimana posisi mitokhondria yang mengelilingi ekor siap memberikan suplai ATP pada akson untuk motilitas spermatozoa.

Principle piece merupakan segmen terpanjang dari ekor sperma, dengan panjang 55 μm .

Terminal piece adalah bagian yang terpendek dengan ukuran 3 μm . Elemen mitokhondria pada akson berakhir pada regio ini, dan lapisan luar spermatozoa pada ujung ekor menghilang.

2.1.3. Seminal Plasma

Volume seminal plasma berkisar antara 2-6 ml, merupakan hasil dari sekresi beberapa kelenjar aksesoris pada saluran reproduksi pria. Seminal plasma yang terkandung dalam ejakulasi semen kurang lebih 95% dari seluruh volume semen (Hafez, 1980).

Kelenjar-kelenjar aksesoris ini meliputi (Soehadi, 1987) :

1. Kelenjar Cowperi dan Littre mensekresi seminal plasma sekitar 0,1-0,2 ml, dan didalamnya mengandung mukoprotein.
2. Kelenjar prostat, ampula, epididimis dan spermatozoa mensekresi seminal plasma sebanyak 0,5 ml. Kelenjar prostat mensekresi seminal plasma sebanyak 13-32 % dari volume

ejakulat, dan mengandung asam sitrat, asam fosfatase, Calcium, Magnesium, Zn dan prostaglandin. Sedangkan epididimis mensekresi seminal plasma yang mengandung carnitine, glycerophosphorylcholine dan protein.

3. Kelenjar vesikula seminalis, mensekresi seminal plasma terbanyak dari volume sperma yaitu 2,0-2,5 ml. Mengandung fruktosa, protein dan prostaglandin.

Seminal plasma berfungsi sebagai penyedia bahan-bahan nutrisi dan sebagai *buffer* yang melindungi spermatozoa dari lingkungan asam vagina, selain itu juga sebagai media transport spermatozoa dari sistem reproduksi pria ke sistem reproduksi wanita. Oleh karena itu dalam proses reproduksi alami, fungsi sebagai media transport sangat penting. Seminal plasma secara fisiologis juga menstimulasi motilitas dan metabolisme spermatozoa (Hafes, 1980).

2.1.4. Motilitas

Motilitas sperma adalah kemampuan gerakan spermatozoa untuk mencapai dan membuahi oosit. Salah satu faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa adalah tersedianya cukup energi dan pola gerakan flagella lurus kedepan. Gerakan flagela penting untuk fungsi reproduksi spermatozoa. Flagela mengandung aksonema dengan mitokhondria sepanjang flagella. Aksonema terdiri dari 9 doublet mikrotubul yang terletak diperifer dan mengelilingi sepasang mikrotubul di bagian tengah. Jadi aksonema struktur silindris dengan pola 9+2. Tiap pasang mikrotubul

perifer dihubungkan lagi dengan bagian tengah tersebut melalui 9 buah fiber secara radial sehingga pola keseluruhannya disebut 9+9+2. Antara doublet mikrotubul dihubungkan dengan jembatan nexin, sedangkan di dalam doublet berhubungan antara satu dengan lainnya melalui dyenin yaitu suatu protein dengan aktifitas ATP-ase. Apabila ada sinyal ionik, maka ATP mitokhondria mengalami hidrolisis menjadi ADP oleh lengan-lengan dyenin tersebut sehingga menimbulkan gerakan-gerakan antara doublet-doublet mikrotubul di dalam aksonema tersebut (Tournaye *et al*, 1994).

Faktor utama yang mengontrol motilitas spermatozoa adalah ATP yang dihasilkan oleh Mitokhondria. Untuk memproduksi ATP, spermatozoa menggunakan sumber dari luar seperti fruktosa, laktat, piruvat, dan glukosa yang tersedia dalam seminal plasma. Spermatozoa mendapat energinya terutama melalui glikolisis dan sebagian lagi berasal dari fosforilasi oksidatif di dalam mitokhondria (Tournaye *et al*, 1994).

Tersedianya ATP juga dikontrol oleh kalsium (Ca), nukleotida siklik dan pH intraseluler. Peranan Ca terhadap motilitas spermatozoa tampaknya tergantung pada tingkat maturasi spermatozoa (Hong *et al*, 1984). *Cyclic adenosin 3',5'-monophosphatase* (c-AMP) merupakan nukleotida siklik yang berfungsi sebagai *second messenger*, telah diketahui turut mengatur metabolisme spermatozoa dan motilitas spermatozoa. Sedangkan pH intraseluler juga diduga mempunyai peran dalam pengaturan motilitas spermatozoa (Goltz *et al*, 1988).

Ca dan albumin dibutuhkan dalam kultur medium sehingga spermatozoa dapat meningkatkan fungsinya dengan tujuan untuk mendapatkan kapasitas atau kemampuan untuk membuahi oosit. Selama kapasitas, spermatozoa mengalami perubahan metabolik, perubahan dalam pola motilitas dan perubahan-perubahan dalam struktur membran (Tournaye *et al*, 1994). Perubahan motilitas disebut hiperaktivasi karena terjadi perubahan gerakan spermatozoa dari pola flagella yang agak kaku menjadi seperti cambuk yang asimetris dengan flagella yang meliuk-liuk. Hiperaktivasi diperlukan oleh spermatozoa untuk dapat menembus sekresi yang dihasilkan oleh tuba fallopii dan melakukan penetrasi di dalam oosit (Tournaye *et al*, 1994).

Hiperaktivasi didahului dengan masuknya Ca ke dalam sel yang mengakibatkan terjadi peningkatan kadar c- AMP intraseluler. Kerja c- AMP adalah mengaktifkan protein kinase - A sehingga terjadi fosforilasi protein yang dapat menyebabkan hiperaktivasi spermatozoa dan meningkatkan motilitas (Cummins *et al*, 1993).

2,1.5. Kondensasi Kromatin

Inti spermatozoa secara struktural adalah bagian kepala spermatozoa. Yang terdiri dari membran sel yang menyelimuti bagian luar sel, dan bagian utama penyusun inti disebelah dalam membran inti yang merupakan bahan genetik inti yang disebut kromatin.

Kromatin terdiri dari benang-benang DNA (Deoxy-ribo Nucleic Acid), dan diselubungi oleh protein inti yang disebut histon. Pada awal

perkembangan spermatozoa, histon-histon ini kaya akan asam amino lysin. Pada tahap awal proses spermiogenesis, kromatin sebagai bahan inti akan mengalami perubahan-perubahan susunan histon-histonnya. Bahan inti ini akan mengalami polimerisasi dan mengalami kondensasi dengan menggantikan protein histon yang kaya akan lysin menjadi suatu nukleotida yang disebut protamin yang kaya akan asam amino arginin dan cystein yang bersifat lebih alkalis (Dadoune & Alfonsi, 1986; Hurrett, 1986; Terqueem & Dadoune, 1983).

Proses kondensasi kromatin inilah yang dianggap bertanggung jawab terhadap maturitas spermatozoa sejak spermiogenesis sehingga terbentuknya spermatozoa normal baik secara struktural maupun secara fungsional (Dadoune & Alfonsi, 1986; Hurrett, 1986; Terqueem & Dadoune, 1983).

Perkembangan embrionik tergantung pada tingkat kerusakan DNA, karena kualitas DNA adalah pembawa material genetik dari generasi ke generasi berikutnya. Kerusakan dalam jumlah yang tinggi dapat mengakibatkan perkembangan embrio yang kurang bagus dan dapat mengakibatkan hilangnya kehamilan awal (Donnelly *et al*, 2001)

2.2. Kriopreservasi

Mekanisme kriopreservasi adalah simpan beku dengan menggunakan krioprotektan yang mana merupakan proses perubahan bentuk fisik timbal balik dari fase cair ke fase padat (beku) dan kembali ke fase cair. Dari fase cair menuju fase padat dilakukan penurunan suhu sampai tingkat tertentu

sampai mencapai suhu jauh dibawah suhu beku (*deep freezing*), misalnya suhu -196°C pada nitrogen cair. Proses ini harus bersifat reversibel ke kondisi awal.

Hal yang terpenting dari kriopreservasi adalah proses terjadinya dehidrasi intraseluler yaitu pengeluaran sebagian besar air intraseluler sebelum terjadi pembekuan intraseluler. Dehidrasi intraseluler mengakibatkan volume air dalam sel menurun, dan terjadi peningkatan konsentrasi larutan pada ekstraseluler, karena larutan intraseluler yang keluar ke ekstraseluler, dan harus sampai tercapai keseimbangan kimiawi antara intraseluler dan ekstraseluler (Mazur dikutip Henry *et al* , 1998; Quin, 1995).

Pada proses pembekuan akan terbentuk kristal es di dalam sel (intraseluler) maupun di luar sel (ekstraseluler). Dehidrasi akan menyebabkan terbentuknya es intraseluler yang lembut, namun jika tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk es intraseluler berukuran besar yang dapat merusak sel secara mekanik (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Kerusakan sel pada proses pembekuan dapat terjadi karena akibat termal (*cold shock*), mekanikal (kristal es intraseluler), kemikal (medium pengencer) dan stres osmotik (tekanan osmotik medium) yang memasuki membran sel (Park and Graham, 1992; Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Untuk menghindari terjadinya kristal es intraseluler, proses dehidrasi intraseluler harus terjadi dengan cara menginduksi kristal es ekstraseluler sehingga osmolaritas cairan ekstraseluler lebih tinggi dari intraseluler dan cairan didalam intraseluler dapat tertarik keluar. Mekanisme proses

pendinginan sangat berpengaruh pada proses dehidrasi intraseluler sel, dimana pembekuan lambat dan pembekuan cepat dapat mengakibatkan kerusakan sel (Henry et al 1998; Zavos et al, 1995). Kecepatan pembekuan yang relatif lambat mengakibatkan pengerutan osmotik karena air intraseluler akan berlebihan difusi keluar sel yang secara osmotik membeku dan menghasilkan konsentrasi larutan ekstraseluler dan intraseluler meningkat sangat tinggi dan mengakibatkan pengerutan sel (Henry et al, 1998). Pembekuan yang relatif cepat tidak memberikan waktu yang cukup bagi air intraseluler melakukan difusi ke ekstraseluler sehingga dapat mengakibatkan pembentukan es intraseluler (Henry et al, 1998). Selain itu Kerusakan sel juga dapat terjadi karena peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan menjadi bersifat toksik karena terbentuknya kristal es ekstraseluler (Wetzel, 1996). Untuk menghindari kerusakan sel pada proses kriopreservasi ini, keluar masuknya air dari sel melalui membran sel perlu diperhatikan.

Spermatozoa manusia sangat resisten terhadap *cold-shock* pada proses pembekuan dibanding spermatozoa hewan. *Cold-shock* ini dapat menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa karena efek pembekuan dalam nitrogen cair yang dilanjutkan proses pencairan (Verheyen et al, 1993). Penurunan motilitas dapat mencapai 30 % (Keel et al, 1997 dikutip Donnelly et al, 2001). Selain itu efek dari pembekuan-pencairan juga mengakibatkan kerusakan pada morfologi dan kondensasi kromatin sperma, baik pada pria fertil maupun yang infertil (Hammadeh et al, 1999).

Salah satu tahapan dalam simpan beku adalah pencairan kembali (*thawing*) pasca pembekuan. Kecepatan penghangatan kembali spermatozoa dapat mempengaruhi kemampuan hidup sel. Dampak penghangatan terhadap sel tergantung pada kecepatan pendinginan. Penelitian yang dilakukan oleh Henry *et al* (1998), mengamati motilitas, fungsi mitokhondria dan ketahanan membran plasma pada pembekuan sperma secara lambat hasilnya lebih rendah pada saat sperma dihangatkan secara cepat dibandingkan pada saat sperma dihangatkan secara lambat. Sesuai dengan apa yang dikatakan oleh Mazur *et al*. (1980) *thawing* yang lambat mempunyai kecenderungan menyebabkan terjadinya kerusakan sel karena memberi waktu untuk terjadinya kristal es yang mikroskopis menjadi bentuk yang lebih besar yang dapat merusak sel (Mazur *et al*, 1981 dikutip Donnelly *et al*, 2001).

2.3. Vitrifikasi

Metode vitrifikasi adalah metode simpan beku dengan cara membenamkan *straw* dari suhu kamar ke suhu -196°C pada nitrogen cair. Metode vitrifikasi umum dipergunakan untuk pembekuan embrio, blastosit maupun oosit. Metode ini lebih efisien dibanding dengan metode simpan beku cara lainnya karena lebih mudah dilakukan dan tidak membutuhkan waktu yang lama serta ekonomis.

Pada tahun 1938 Luyet dan Hodapp telah berhasil melakukan vitrifikasi terhadap sperma katak, dan empat tahun kemudian Shaffner (1942) memodifikasi teknik Luyet dengan menggunakan spermatozoa

unggas. Percobaan awal pada vitrifikasi spermatozoa mammalia menghasilkan kelangsungan hidup spermatozoa yang rendah bahkan nol (Hoagland *and* Pincus, 1942; Smith, 1961). Pada awal tahun 1980 an, Rall dan Fahy (1985) melakukan vitrifikasi embrio dengan menggunakan konsentrasi krioprotektan yang pekat dan dengan kecepatan pendinginan dan penghangatan yang relatif pelan, dan sejak saat itulah cara utama vitrifikasi spermatozoa telah dianggap sama sebagai metode yang digunakan untuk tipe sel mammalia lainnya (Rall, 1991 dikutip dari Isachenko, 2003). Setelah itu banyak peneliti yang melakukan penelitian dengan metode vitrifikasi pada sel-sel lainnya bahkan organ.

Mekanisme pada metode vitrifikasi adalah pemadatan larutan karena meningkatnya viskositas selama pembekuan sehingga larutan menjadi vitreous (seperti kaca) (Supriatna & Pasaribu, 1992; Niemann 1991). Proses Dehidrasi pada metode simpan beku vitrifikasi berjalan sangat cepat karena material yang akan dibekukan diletakkan pada medium hiperosmolaritas dan langsung dibenamkan kedalam suhu -196°C pada nitrogen cair, tidak terbentuk kristal es yang disebabkan karena terjadinya larutan vitreous (Wetzel, 1996). Larutan vitreous dapat cepat terjadi dengan menggunakan teknik OPS (*Open Pulled Straw*) seperti penelitian yang dilakukan pada vitrifikasi embrio Sapi (M. Lopatarova *et al*, 1999), dan keberhasilan vitifikasi pada stem sel embrio manusia yang dilaporkan oleh Reubinooff pada tahun 2001 (Isachenko, 2003).

Krioprotektan sangat berperan pada metode vitrifikasi, dimana krioprotektan yang dipergunakan lebih dari satu, yang mana krioprotektan

untuk vitrifikasi dibutuhkan dalam jumlah tertentu sampai mencapai konsentrasi kepekatan dari kombinasi krioprotektan tersebut (Fahy, 1988 disadur dari Isachenko, 2003). Krioprotektan ini meningkatkan dan menstabilkan kondisi kinetik dari vitrifikasi, sedikit berpenetrasi dan mempunyai daya tarik menarik yang kuat dengan molekul air, sehingga membuat pertumbuhan kristal es lebih sulit. Pada proses vitrifikasi, proses kimiawi dan toksisitas osmotik meningkat sehingga krioprotektan yang dipergunakan harus memiliki toksisitas rendah, mempunyai bentuk kaca yang baik dan cenderung mengurangi *critical cooling rates* (Allahbadia, 2000).

Kerusakan sel pada metode ini dapat disebabkan oleh toksisitas akibat penggunaan krioprotektan yang berkonsentrasi tinggi (Supriatna & Pasaribu, 1992). Larutan vitrifikasi mempunyai beberapa kriteria yaitu larutan yang dipergunakan harus mengandung satu atau lebih krioprotektan intraseluler yang berkonsentrasi tinggi, setiap larutan mengandung komponen garam fisiologis dan harus ditambahkan makromolekul untuk menambah kemampuan jaringan terhadap kondisi yang sangat beku dan vitreous (Niemann, 1991).

Selain krioprotektan, penghangatan atau pencairan kembali (*thawing*) pada vitrifikasi juga dapat membuat kerusakan sel. Pada vitrifikasi, pencairan dilakukan dengan sangat cepat untuk menghindari kristal es yang dapat terbentuk pada saat penghangatan (Supriatna & Pasaribu, 1992).

2.4. Krioprotektan

Krioprotektan adalah bahan yang berfungsi memberi proteksi pada spermatozoa terhadap suhu rendah sehingga kerusakan sel dapat dihindari. Maksimov (1913) menyatakan bahwa pada tahun 1908 adalah awal orang mengenal kriostabilitas, yaitu mengenai efek-efek yang menguntungkan dari krioprotektan seperti glycerol dan sucrose. Pada tahun 1937, Berstein dan Petropavlovsky mendemonstrasikan efek-efek positif 1 mol/l glycerol pada pembekuan spermatozoa hingga -21°C pada kelinci, marmut, sapi jantan, biri-biri jantan, kuda jantan dan babi. Pada akhir tahun 1940 an, telah dipublikasikan hasil-hasil penelitian yang didasarkan pada penggunaan glycerol oleh Polge, Smith dan Parkers di UK (1949) demikian pula dengan Smimov (1949, 1974) dan Milovanov (1962) di USSR. Metode ini dikembangkan ditahun 1950 an untuk digunakan pada beberapa species, dan tetap digunakan hingga saat ini (disadur dari Isachenko *et al*, 2003).

Krioprotektan yang digunakan untuk pembekuan dibagi menjadi dua macam yaitu krioprotektan intraseluler dan krioprotektan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler memiliki ukuran molekul lebih kecil sehingga dapat keluar masuk sel melalui membran sel dengan memanfaatkan perbedaan tekanan osmosis dan memberikan perlindungan terhadap sitoplasma. Krioprotektan ekstraseluler mempunyai ukuran lebih besar sehingga tidak dapat menembus membran sel dan menimbulkan kondisi dehidrasi intrasel akibat tekanan osmosis tanpa harus masuk ke dalam sel (Hozumi, 2001). Krioprotektan ekstraseluler yang umum digunakan untuk

pembekuan sperma antara lain adalah gula (misalnya sucrose, glucosa, fructose), protein dan lipoprotein dan kuning telur. Krioprotektan intraseluler yang umum digunakan adalah Glycerol, Dimetihylsulfoxide (DMSO) dan Ethylene Glycol, untuk spermatozoa manusia dimana penggunaan Glycerol lebih superior dibandingkan yang lain (Graham & Crabo, 1978).

Glycerol dengan BM 92,9 g / mol mempunyai mekanisme kerja sebagai berikut (1) menurunkan titik beku solut intraseluler, (2) interaksi dengan membran sel yang menyebabkan perubahan dari relatif cair menjadi padat selama pembekuan, (3) mencegah terjadinya perubahan konsentrasi elektrolit intraseluler dan ekstraseluler dengan cara mengikat elektrolit dan sebagian air (Winarso & Hinting, 1999), sehingga mencegah akumulasi H₂O dan mencegah kristalisasi pada daerah titik beku larutan. Selain itu juga melindungi spermatozoa terhadap pembentukan kristal es. Glycerol merupakan substansi yang langsung berdifusi ke dalam sel sperma dan membentuk fruktosa, sehingga secara anaerob memiliki persediaan fruktosa yang aktif, sedikit asam laktat yang dihasilkan namun memiliki aktifitas yang optimal ((Salisbury *and* Van Demark, 1985). Konsentrasi glycerol yang telah dilaporkan oleh beberapa peneliti mempunyai konsentrasi optimal untuk pembekuan berkisar antara 7 sampai 10%, peneliti lainnya telah membandingkan konsentrasi glycerol dari 0, 5, 10 dan 15 % dengan rata-rata *recovery* secara berturut-turut 13, 72, 46 dan 15 % (Graham & Crabo, 1978). Penggunaan glycerol 10% telah dibuktikan oleh Pilikian *et al* (1982) bahwa memberikan lingkungan

yang lebih baik bagi kelangsungan hidup spermatozoa dan motilitasnya selama proses pembekuan dan pencairan (Allahbadia, 2002). Penelitian yang telah dilakukan Donnelly *et al* (2001) menggunakan krioprotektan glycerol 15 % dengan hasil yang memuaskan.

Penggunaan *buffer* untuk proses pembekuan spermatozoa yang umum digunakan adalah *buffer* 'zwitterionic' yang terdiri dari TES, HEPES, dan TRIS yang fungsinya sebagai *buffer universal* (Graham & Crabo, 1978). Penambahan *buffer* pada medium selama pembekuan sangat penting untuk mencegah terjadinya kerusakan spermatozoa. Pada medium pembekuan penambahan Human Serum Albumin (HSA) dipergunakan untuk meningkatkan kualitas dari ketahanan hidup dan stabilitas membran spermatozoa pada proses simpan beku (Allahbadia, 2002).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

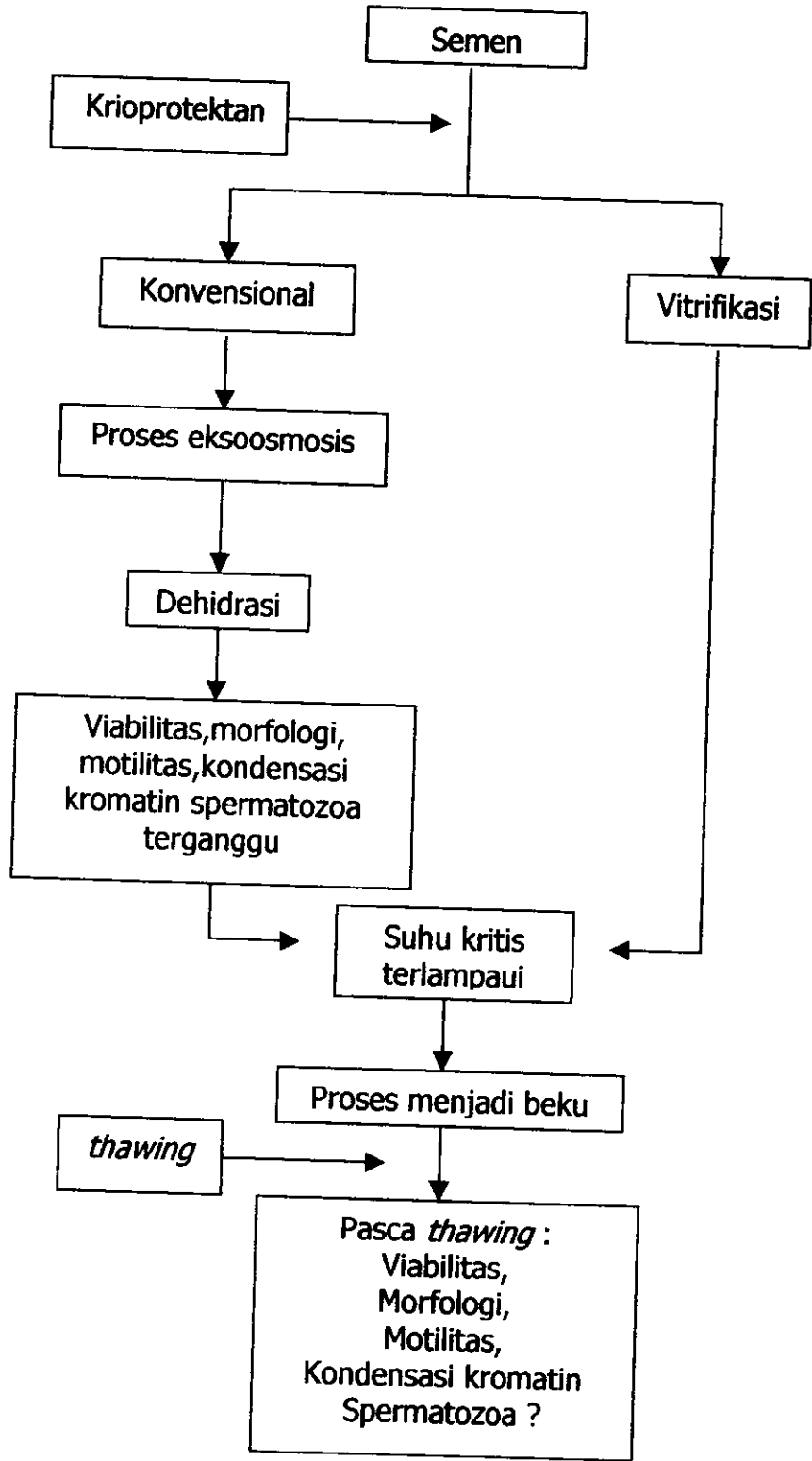
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

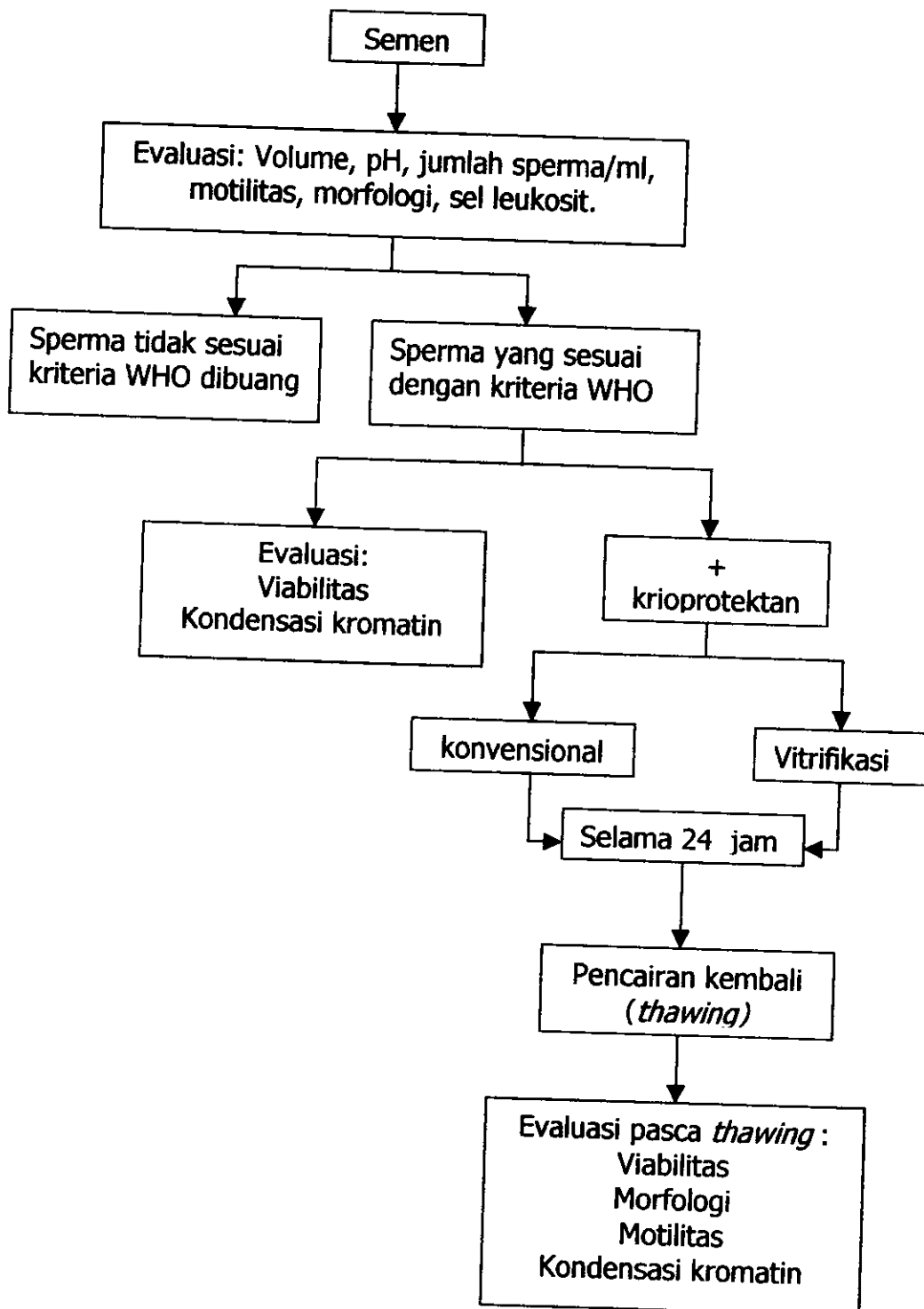
Simpan beku atau kriopreservasi sperma secara konvensional adalah penyimpanan sperma pada suhu yang sangat rendah dalam nitrogen cair (-196°C) dengan dicampur krioprotektan terlebih dahulu dan dilakukan penurunan suhu secara bertahap sehingga memerlukan waktu yang lebih lama. Selain itu, selama proses kriopreservasi dengan metode ini spermatozoa akan mengalami eksoosmosis, yaitu keluarnya air intraseluler sampai terjadi keseimbangan kimiawi antara intraseluler dan ekstraseluler. Dehidrasi intraseluler menyebabkan peningkatan konsentrasi solut dalam intraseluler tersebut, menyebabkan terjadinya pembentukan kristal es, sehingga dapat mengakibatkan kerusakan sel yang akhirnya mempengaruhi viabilitas, morfologi, motilitas maupun kondensasi kromatinnya. Oleh karena itu menurut Whittingham (1979) yang dikutip dari Winarso dan Hinting (1999) perlu diperhatikan suhu kritis selama proses pembekuan yaitu antara -4°C sampai -60°C .

Kriopreservasi dengan metode vitrifikasi, dimana sperma yang telah dicampur krioprotektan dari suhu ruangan langsung dibenamkan kedalam nitrogen cair (-196°C) tanpa melalui proses penurunan suhu secara bertahap, sehingga memerlukan waktu yang lebih singkat. Pada metode vitrifikasi, mekanisme yang terjadi adalah karena berlangsungnya pemadatan larutan sehingga viskositas selama pembekuan meningkat

dan larutan berubah menjadi larutan yang vitreous (seperti kaca) dan tidak terjadi kristalisasi (Kobayashi *et al*, 1990; Niemann, 1991; Quinn, 1995; Supriatna & Pasaribu, 1992; Wetzel, 1996).

Skema Kerangka Konseptual :



Kerangka Kerja :

3.2. Hipotesa Penelitian

Ada perbedaan antara metode vitrifikasi dan metode konvensional pada kualitas spermatozoa yang dinyatakan dengan (1) Viabilitas (2) Morfologi (3) Motilitas dan (4) Kondensasi Kromatin setelah pencairan kembali (*thawing*).

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

4.1.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni (*true experimental*) yang dilakukan di laboratorium.

4.1.2. Rancangan penelitian

Rancangan yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Randomized post test - only control group design*.

4.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fertilisasi *In-vitro* Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya, dan berlangsung dari bulan September 2002 sampai bulan Februari 2003.

4.3. Populasi, Sampel dan Besar Sampel

4.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah semua ejakulat penderita yang datang ke poli Andrologi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya yang memenuhi kriteria pria normozoospermia sesuai dengan kriteria WHO 1992 yaitu :

Volume : $\geq 2,0$ ml

pH : 7,2 – 8,0

Jumlah spermatozoa	: ≥ 20 juta spermatozoa / ml
Motilitas	: ≥ 50 % katagori a + b atau ≥ 25 % katagori a (a : gerak spermatozoa cepat dan lurus ke muka , b : bergerak lambat tidak lurus)
Morfologi	: ≥ 30 % bermorfologi normal
Sel leukosit	: < 1 juta / ml

4.3.2. Sampel dan Besar Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah ejakulat yang diambil dari pasien yang datang ke poli Andrologi Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya yang memenuhi kriteria WHO. Pengambilan sampel berdasarkan rumus Hulley dan Cumming (1998) :

$$N = 2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 (E/S)^2$$

E/S : Besar Efek yang dibakukan (Standardized Effect Size)

E : Besar Efek Harapan (Expected Effect Size)

S : Simpang Baku Variable tergantung

dimana harga Z_{α} adalah 1,96 dan harga Z_{β} adalah 0,84 maka :

$$N = 8$$

sampel penelitian yang dipakai sebanyak 10 untuk menghindari faktor kesalahan.

4.4.Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.4.1. Variabel Penelitian

4.4.1.1. Variabel Tergantung (Dependent Variable)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah viabilitas spermatozoa, morfologi spermatozoa, motilitas spermatozoa dan kondensasi kromatin spermatozoa setelah mengalami proses pembekuan.

4.4.1.2. Variabel Bebas (Independent Variable)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah (1) Pemeriksaan Awal (2) Metode simpan beku konvensional dengan menggunakan Glycerol 15 % + HEPES + Human Serum Albumin 0,4 % (*Medium freeze, fertipro, Belgia*) sebagai krioprotektan dan (3) Metode Vitrifikasi dengan mempergunakan krioprotektan yang sama.

4.4.1.3. Variabel Kendali

Variabel pengendali pada penelitian ini adalah volume, pH, jumlah spermatozoa dan sel leukosit.

4.4.2. Definisi Operasional Variabel

1. Viabilitas spermatozoa

Penilaian terhadap viabilitas spermatozoa berdasarkan persentase spermatozoa yang hidup. Dengan pewarnaan Eosin, sesuai petunjuk teknik pulasan vitalitas sperma pada penuntun laboratorium WHO 1992. Spermatozoa yang hidup tidak berwarna, sedangkan spermatozoa yang mati berwarna merah.

2. Morfologi spermatozoa

Pada morfologi sperma pengamatannya berdasarkan persentase bentuk normal dari spermatozoa menurut WHO 1992 yaitu :

- A) Kepala : bentuk oval , berbatas tegas, panjang 4,0-5,5 μm dan lebar 2,5 – 3,5 μm , daerah akrosom meliputi 40-70% area kepala.
- B) Leher (mid-piece) : perbandingan panjang dan lebar harus 1,5-1,75 dan tidak ada tetesan sitoplasma lebih dari 1/3 ukuran kepala sperma.
- C) Ekor : tidak ada kelainan. Menurut katagori Kruger *et al* (1988) ekor spermatozoa yang normal mempunyai panjang 40-50 μm , lurus dan ramping.

3. Motilitas spermatozoa

Motilitas atau daya gerak spermatozoa berdasarkan katagori dari WHO 1992 yaitu sebagai berikut :

- a : bergerak cepat dan lurus ke muka.
- b : bergerak lambat atau sulit maju lurus atau bergerak tidak lurus.
- c : tidak bergerak maju (bergerak ditempat).
- d : tidak bergerak.

penilaiannya berdasarkan persentase motilitas (a + b).

4. kondensasi kromatin Spermatozoa

Pengukuran kondensasi kromatin spermatozoa berdasarkan persentase kondensasi kromatin yang baik dengan pewarnaan asam biru anilin. Tiga kriteria penilaian yaitu tidak terwarnai, terwarnai dan terwarnai sebagian (Terqueem *and* Daddune, 1983). Spermatozoa normal yang secara total terwarnai dengan asam biru anilin menunjukkan persistensi lysin yang kaya protein terkait dengan gangguan kondensasi kromatin. Untuk lebih mudahnya kriteria diatas disusun dengan model sebagai berikut :

KRB (Kromatin baik) : adalah spermatozoa yang kromatinnya tidak berwarna biru atau tetap transpsran.

KRS (Kromatin sedang) : adalah spermatozoa yang kromatinnya berwarna biru sebagian.

KRJ (Kromatin jelek) : adalah spermatozoa yang kromatinnya berwarna biru semua.

4.5. Materi dan Bahan Penelitian

4.5.1. Subyek Penelitian

Sebagai subyek penelitian adalah sperma atau ejakulat dari pria yang sehat, tidak melakukan hubungan seksual atau aktivitas seksual ("abstinensia") selama 3-4 hari. Sperma diperoleh dengan masturbasi tanpa menggunakan alat penunjang misalnya jely, sabun dan sebagainya, kemudian sperma ditampung dalam gelas tabung, dan sperma dianalisa setelah likuefaksi atau tidak lebih dari dua jam setelah likuefaksi.

4.5.2. Bahan dan Alat Penelitian

4.5.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah krioprotektan Ethylene Glycol, Sukrose, Human Serum Albumin (HSA), *Medium freeze* (*Fertipro, Belgia*), PBS (Phosphat *Buffer* Saline), larutan pewarna Safranin dan kristal violet, metanol, larutan *buffer* phosphat pH 6,8, Anilin biru 5%, larutan fixatif glutaraldehyde 3% dalam *buffer* phosphate 0,2 M pH 3,5, Eosin B, negrosin, aquadest, .

4.5.2.2. Alat Penelitian

Alat yang dipergunakan untuk penelitian ini terdiri dari:

Lab /ruangan berventilasi, gelas penampung sperma, tabung Nitrogen cair + Nitrogen cair, canting, *straw* 0,25 ml, wax, mikro pipet, thermometer, almari es, pemangas air (*water bath*), mikroskop cahaya, *Hand tally counter*, gelas obyek dan gelas penutup, pH paper indikator spesial dari Merck pH 6,4 – 6,8, batang gelas pengaduk, staining disk, makler counting chamber, gelas Beaker, tabung reaksi dengan tutup, spuit, cawan petri.

4.6. Pelaksanaan Penelitian

4.6.1. Metode Simpan Beku konvensional

Pelaksanaan pada metode simpan beku konvensional mulai dari sperma segar sampai sperma menjadi beku melalui beberapa tahap, yaitu:

1. Sebanyak 1 bagian sperma yang sudah dilikuefaksi sempurna ditambah 1 bagian medium krioprotektan yaitu Glycerol 15 % + HEPES + Human Serum Albumin 0,4 % (*Medium freeze, Fertipro, Belgia*), kemudian didiamkan 10 menit untuk equilibrasi.
2. Campuran sperma dan krioprotektan dimasukkan kedalam *straw*, kemudian dilakukan penutupan dengan *wax* pada ujung *straw* pada sisi yang terbuka.
3. Dilakukan *labelling* pada tiap-tiap *straw* yang telah diisi sperma dan krioprotektan kemudian dilakukan simpan beku.
4. Sampel berturut-turut disimpan dalam almari es atau pada suhu 4°C selama 15 menit, kemudian dipindahkan ke *freezer* pada suhu -20°C selama 30 menit (dengan harapan suhu turun permenit sebanyak 1°C) (Winarso H & Hinting A, 1999), selanjutnya di masukkan ke dalam cangkir dan cangkir tersebut di masukkan ke dalam kontainer berturut-turut; 10 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 10 menit, 5 cm diatas nitrogen cair selama 10 menit, kemudian dibenamkan ke dalam nitrogen cair secara perlahan-lahan.

4.6.2. Metode Pencairan (*thawing*)

Periode penyimpanan sperma dalam bentuk beku tidak ada batasan waktu, namun dalam penelitian ini setelah penyimpanan selama lebih dari 24 jam dilakukan pengambilan *straw* dari nitrogen cair untuk dilakukan pencairan kembali (*thawing*).

4.6.3. Pelaksanaan vitrifikasi

1. Sebanyak 1 bagian sperma yang sudah dilikuefaksi sempurna ditambah 1 bagian medium krioprotektan yaitu Glycerol 15 % + HEPES + Human Serum Albumin 0,4 % (*Medium freeze, Fertipro, Belgia*).
2. Proses selanjutnya dilakukan sama seperti cara 2 dan 3 pada simpan beku konvensional.
3. Sampel langsung dibenamkan pada nitrogen cair (suhu -196°C).

4.6.4. Pencairan (*thawing*) Vitrifikasi

Setelah dibekukan di dalam nitrogen cair selama lebih dari 24 jam dilakukan pencairan kembali, *straw* diambil dari nitrogen cair, setelah itu dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup, kemudian *straw* dimasukkan ke dalam penangas air 37°C sampai kristal es hilang (± 2 menit).

4.6.5. Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa

Untuk menghitung persentase viabilitas spermatozoa didasarkan pada cara pewarnaan dengan Eosin B 1%, yang caranya berturut-turut sebagai berikut :

1. Setelah ujung *straw* yang ditutup wax dipotong, sperma dalam *straw* ditetaskan sebanyak satu tetes di atas gelas obyek kemudian ditambahkan 1 tetes Eosin B 1% , setelah itu diaduk rata.
2. Kemudian ditutup dengan kaca tutup.
3. Setelah 1 - 2 menit, diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X.

4.6.6. Pemeriksaan Morphologi Spermatozoa (Pieterono, 1978)

Penghitungan persentase morfologi spermatozoa normal dengan menggunakan teknik yang dipergunakan oleh laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran UNAIR dengan cara pewarnaan O. Steeno yang dimodifikasi, yaitu :

1. Sperma yang telah dilikuefaksi dengan sempurna atau yang telah dicairkan kembali setelah proses pembekuan, diambil 1 atau 2 tetes diletakkan pada gelas obyek kemudian dibuat hapusan dan dibiarkan kering di udara.
2. Difiksasi dengan larutan metanol selama 5 menit.
3. Setelah kering dilakukan pewarnaan dengan larutan Safranin selama 5 menit.
4. Dibilas dengan mencelupkan kedalam larutan *bufer* phosphat dengan PH 6,8 dua kali berturut-turut.
5. Setelah kering direndam kedalam larutan kristal violet selama 5 menit.
6. Kemudian dibilas dengan mencelupkan sediaan ke dalam aquades dalam gelas Beaker dan dikeringkan di udara dalam posisi bersandar.
7. Diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 X , menggunakan minyak immersi.

4.6.7. Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Untuk menilai persentase motilitas dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. 1 atau 2 tetes sperma yang telah dicairkan kembali pasca pembekuan diletakkan pada gelas obyek dan ditutup dengan kaca tutup.
2. Diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X.

4.6.8. Pemeriksaan kondensasi kromatin Spermatozoa

Untuk menghitung persentase kondensasi kromatin menggunakan cara sebagai berikut (Terqueem & Daddune, 1983) :

1. Sperma yang telah dilikuefaksi dengan sempurna atau yang telah dicairkan kembali setelah proses pembekuan, dibuat hapusan diatas gelas obyek dan dibiarkan kering diudara.
2. Setelah kering difiksasi dengan larutan glutaraldehyde 3% dalam *buffer* phosphate 0,2 M pH 3,5 selama 30 menit
3. Kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam biru Anilin 5% selama 5 menit.
4. Selanjutnya dicuci dengan aquades, kemudiaan dikeringkan di udara.
5. Diperiksa dibawah mikroskop cahaya, dengan pembesaran 1000 X dengan menggunakan minyak immersi.

4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisa secara statistik dengan uji deskriptif, uji normalitas dan dilanjutkan dengan uji Manova, karena variabel tergantung pada penelitian ini lebih dari satu.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil Uji Coba Penelitian

Pada awal penelitian ini dilaksanakan, dilakukan uji coba pada metode vitrifikasi dengan menggunakan krioprotektan Ethylene Glycol (EG) + Sucrose + Human Serum Albumin (HSA) dengan konsentrasi berbeda. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.1.1. dibawah ini.

Tabel 5.1.1. Persentase morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi Kromatin pada simpan beku spermatozoa dengan metode Vitrifikasi yang menggunakan krioprotektan EG + Sucrose + HSA dengan konsentrasi yang berbeda, dan simpan beku metode Konvensional dengan Medium *freeze* Fertipro (Belgia) dan Awal pemeriksaan.

Konst EG (%)	Konst S (M)	HAS (%)	Morfologi (%)			Motilitas (%) (a + b)			Viabilitas (%)			Kondensasi Kromatin (%)		
			A	KF	V	A	KF	V	A	KF	V	A	KF	V
40	0,3	6	40	28	10	60	9	0	80	16	1	90	74,9	66,4
	0,2		40	28	12	60	10	0	80	14	0	90	74,9	66,2
	0,1		36	18	10	40	10	0	77	16	1	82,6	65,3	70
30	0,3	6	32	20	8	60	27	0	77	27	0	84	80,3	70
	0,2		30	20	10	78	27	0	78	27	1	84,1	80,3	71,3
	0,1		36	18	12	40	10	0	77	16	2	82,6	77,6	69,2
20	0,3	6	34	18	8	60	24	0	68	28	0	88,7	81,3	68,2
	0,2		34	18	8	60	24	0	68	28	1	88,7	81,3	69,8
	0,1		34	18	6	60	24	0	68	28	0	88,7	81,3	72,1
10	0,3	6	34	18	10	60	24	0	68	28	0	88,7	81,3	70,2
	0,2		34	18	8	60	24	0	68	28	0	88,7	81,3	71,4
	0,1		34	18	8	60	24	0	68	28	0	88,7	81,3	73,3

Keterangan :

Konst : Konsentrasi

S : Sucrose

A : Awal

KF : Konvensional dengan Fertipro

EG : Ethylene Glycol

HSA : Human Serum Albumin

V : Vitrifikasi

Tabel 5.1.2. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 40% + Sucrose 0,3 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (° C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	60	20	80	51
- 20	60	21	80	40
- 40	60	0	80	2
- 60	60	0	80	3
- 80	60	0	80	0

Tabel 5.1.3. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 40 % + Sucrose 0,2 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (° C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	60	26	80	57
- 20	60	22	80	44
- 40	60	7	80	12
- 60	60	0	80	5
- 80	60	0	80	1

Tabel 5.1.4. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 40 % + Sucrose 0,1 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (° C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	50	14	77	20
- 20	50	8	77	9
- 40	50	3	77	18
- 60	50	1	77	22
- 80	50	2	77	10

Tabel 5.1.5. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 30 % + Sucrose 0,3 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (° C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	60	9	77	34
- 20	60	7	77	36
- 40	60	2	77	10
- 60	60	6	77	19
- 80	60	1	77	8

Tabel 5.1.6. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 30 % + Sucrose 0,2 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (° C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	78	38	78	55
- 20	78	24	78	38
- 40	78	28	78	37
- 60	78	2	78	3
- 80	78	1	78	1

Tabel 5.1.7. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 30 % + Sucrose 0,1 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (° C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	50	9	77	34
- 20	50	7	77	36
- 40	50	2	77	10
- 60	50	6	77	19
- 80	50	6	77	19

Tabel 5.1.8. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan penggunaan krioprotektan EG 20 % + Sucrose 0,3 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (°C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	56	10	60	30
- 20	56	8	60	28
- 40	56	3	60	20
- 60	56	5	60	16
- 80	56	2	60	3

Tabel 5.1.9. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan menggunakan krioprotektan EG 20 % + Sucrose 0,2 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (°C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	56	32	60	41
- 20	56	28	60	34
- 40	56	17	60	26
- 60	56	10	60	18
- 80	56	3	60	4

Tabel 5.1.10. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan menggunakan krioprotektan EG 20 % + Sucrose 0,1 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (°C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	52	23	54	35
- 20	52	20	54	28
- 40	52	16	54	21
- 60	52	16	54	20
- 80	52	5	54	12

Tabel 5.1.11. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan menggunakan krioprotektan EG 10 % + Sucrose 0,3 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (°C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	52	15	54	25
- 20	52	16	54	25
- 40	52	12	54	18
- 60	52	10	54	14
- 80	52	6	54	8

Tabel 5.1.12. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan menggunakan krioprotektan EG 10 % + Sucrose 0,2 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (°C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	50	34	52	39
- 20	50	32	52	40
- 40	50	26	52	32
- 60	50	18	52	30
- 80	50	12	52	15

Tabel 5.1.13. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan menggunakan krioprotektan EG 10 % + Sucrose 0,1 M + HSA 6 % pada penurunan suhu berbeda.

Suhu (°C)	Motilitas (a+b) (%)		Viabilitas (%)	
	Awal	Pencairan	Awal	Pencairan
4	50	35	52	40
- 20	50	30	52	38
- 40	50	30	52	33
- 60	50	22	52	32
- 80	50	11	52	16

Tabel 5.1.14. Persentase morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin spermatozoa setelah kriopreservasi metode konvensional dan metode vitrifikasi dengan menggunakan Medium *Freeze* (Fertipro, Belgia) serta metode vitrifikasi tanpa krioprotektan.

KS	Pria 1				Pria 2				Pria 3			
	A	K	V F	V tk	A	K	V F	V tk	Al	K	V F	V tk
Morfo	32	26	24	24	30	26	16	20	32	20	18	20
Motil	66	33	29	30	50	25	7	7	52	24	18	20
Viab	84	38	32	33	52	28	8	8	54	24	18	21
KK	90,5	80,4	74	86,6	88,1	80,4	74	87,6	90	82,2	78,5	80,4

Keterangan :

KS : Kualitas spermatozoa

A : Awal

K : Konvensional

V F : Vitrifikasi dengan Medium *freeze*

V tk : Vitrifikasi tanpa krioprotektan

KK : Kondensasi Kromatin

Morfo : Morfologi

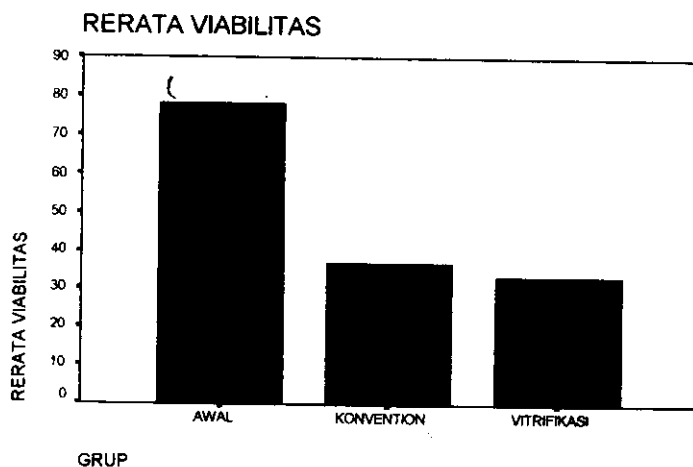
Motil : Motilitas

Viab : Viabilitas

5.2. Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian pada sperma dari 10 orang normozoospermia. Sampel yang dipergunakan telah memenuhi syarat-syarat penelitian yang telah ditetapkan serta menurut kriteria WHO 1992. Pada penelitian ini, kriopreservasi spermatozoa dilaksanakan baik dengan metode konvensional maupun metode vitrifikasi, krioprotektan yang digunakan adalah medium *freeze* (Fertipro, Belgia) yang mengandung Glycerol 15% + HEPES + HSA 0,4 %.

VIABILITAS



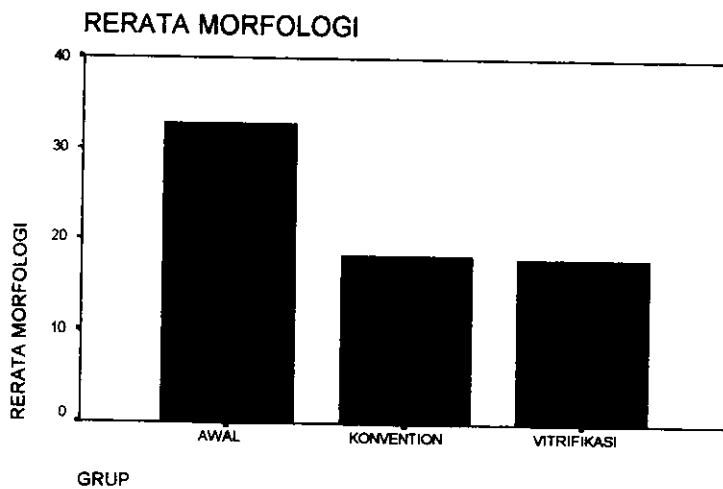
Gambar 5.2.1. Diagram Bar Viabilitas spermatozoa sebelum dan setelah dikriopreservasi dengan metode konvensional maupun metode vitrifikasi.

Keterangan :

Rata-rata viabilitas spermatozoa setelah kriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi lebih rendah dibandingkan dengan sebelum dilakukan kriopreservasi (awal), namun sementara viabilitas

spermatozoa pada metode konvensional dan metode vitrifikasi tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

MORFOLOGI

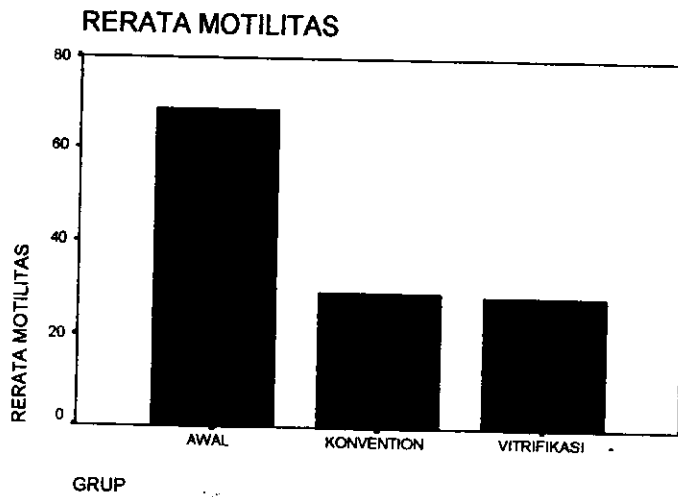


Gambar 5.2.2. Diagram Bar Morfologi spermatozoa sebelum dan setelah dilakukan kriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi.

Keterangan:

Rata-rata morfologi normal spermatozoa setelah kriopresevasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi lebih rendah dibandingkan dengan awal, namun sementara morfologi normal spermatozoa setelah dilakukan kriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi tampak hampir sama atau tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

MOTILITAS

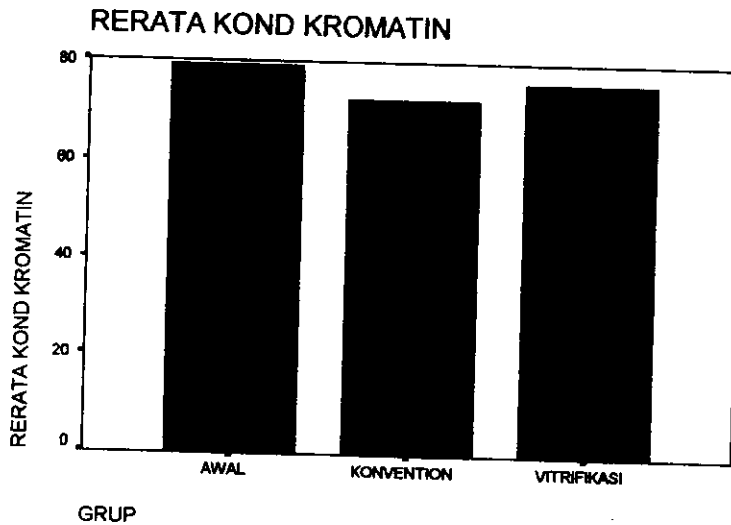


Gambar 5.2.3. Diagram Bar Motilitas spermatozoa sebelum dan setelah kriopreservasi pada metode konvensional dan metode vitrifikasi.

Keterangan:

Rata-rata motilitas spermatozoa setelah kriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi lebih rendah dibandingkan dengan sebelum dikriopreservasi (awal), namun sementara motilitas spermatozoa setelah dilakukan kriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi tampak hampir sama atau tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

KONDENSASI KROMATIN



Gambar 5.2.4. Diagram Bar Kondensasi Kromatin spermatozoa sebelum dan setelah dilakukan kriopresrevasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi.

Keterangan :

Rata-rata kondensasi kromatin spermatozoa sebelum dan setelah kriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi tampaknya kurang lebih sama atau tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Tabel 5.2.1. Uji Manova kualitas spermatozoa antar kelompok

Kualitas Spermatozoa	Kelompok			Harga P
	Awal ($\bar{x} \pm SD$)	Konvensional ($\bar{x} \pm SD$)	Vitrifikasi ($\bar{x} \pm SD$)	
Morfologi	32,8 $\pm$ 3,01	18,2 $\pm$ 3,33	18,0 $\pm$ 2,98	0,0001
Motilitas	68,4 $\pm$ 5,50	29,3 $\pm$ 12,26	28,8 $\pm$ 11,31	0,0001
Viabilitas	78,4 $\pm$ 5,37	36,7 $\pm$ 11,04	33,1 $\pm$ 12,55	0,0001
Kondensasi Kromatin	74,26 $\pm$ 8,54	72,4 $\pm$ 5,32	75,75 $\pm$ 9,11	0,168

Keterangan :

Hasil uji Manova menunjukkan ada perbedaan bermakna pada morfologi, motilitas dan viabilitas spermatozoa antar ke - 3 kelompok ($p < 0,05$), sedangkan pada kondensasi kromatin tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Selanjutnya pada variabel yang menunjukkan perbedaan bermakna dilakukan uji komparasi ganda seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.2.2. Uji komparasi ganda L SD kualitas spermatozoa antar 2 kelompok.

Kualitas Spermatozoa	Kelompok		Beda rata-rata	Harga p
Morfologi	Awal	Konvensional	14,6	0,0001
	Awal	Vitrifikasi	14,8	0,0001
	Konvensional	Vitrifikasi	0,2	0,887
Motilitas	Awal	Konvensional	39,1	0,0001
	Awal	Vitrifikasi	39,6	0,0001
	Konvensional	Vitrifikasi	0,5	0,913
Viabilitas	Awal	Konvensional	41,5	0,0001
	Awal	Vitrifikasi	45,1	0,0001
	Konvensional	Vitrifikasi	3,6	0,434

Keterangan :

- Pada morfologi normal spermatozoa ada perbedaan yang bermakna antara kelompok awal dengan kelompok konvensional dan vitrifikasi ($p < 0,05$), sedangkan antara konvensional dan vitrifikasi tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$).
- Pada motilitas spermatozoa ada perbedaan yang bermakna antara kelompok awal dengan kelompok konvensional dan vitrifikasi ($p < 0,05$), sedangkan antara konvensional dan vitrifikasi tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$).
- Pada Viabilitas spermatozoa ada perbedaan bermakna antara kelompok Awal dengan kelompok konvensional dan vitrifikasi ($p < 0,05$), sedangkan antara konvensional dan vitrifikasi tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$).

Tabel 5.2.3. Penurunan kualitas spermatozoa yang telah di kriopreservasi baik dengan metode konvensional maupun dengan metode vitrifikasi.

Kualitas Spermatozoa	Metode Pembekuan	Rata-rata Penurunan (%)
Morfologi	Konvensional	44,50
	Vitrifikasi	45,12
Motilitas	Konvensional	57,16
	Vitrifikasi	57,89
Viabilitas	Konvensional	52,93
	Vitrifikasi	57,53
Kondensasi kromatin	Konvensional	8,64
	Vitrifikasi	4,43

Keterangan :

- Penurunan kualitas spermatozoa yang telah dikriopreservasi untuk morfologi normal sebesar 44,5 % pada metode konvensional dan 45,12 % pada metode vitrifikasi.
- Penurunan kualitas spermatozoa yang telah di kriopreservasi untuk motilitas sebesar 57,16 % pada metode konvensional dan 57,89 % pada metode vitrifikasi.
- Penurunan kualitas spermatozoa yang telah di kriopreservasi untuk viabilitas sebesar 52,93 % pada metode konvensional dan 57,53 % pada metode vitrifikasi.
- Penurunan kualitas spermatozoa yang telah di kriopreservasi untuk kondensasi kromatin sebesar 8,64 % pada metode konvensional dan 4,43 % pada metode vitrifikasi.

BAB 6

PEMBAHASAN

Aplikasi klinik kriopreservasi telah dikembangkan secara luas, teknik-teknik baru yang digunakan untuk spermatozoa manusia sampai saat ini masih tetap tidak sempurna. Kriopreservasi menyebabkan kerusakan besar pada spermatozoa terutama yang menyangkut membran sperma dan penurunan motilitas spermatozoa (Crister *et al*, 1987). Pasca pencairan banyak spermatozoa yang imotil atau secara psikologis diubah oleh prosedur pembekuan dan pencairan (Zavos, 1991 disadur Panayota *et al*, 1998).

Penelitian-penelitian yang selama ini telah dilakukan dengan metode vitrifikasi umumnya dilakukan pada sel besar, jaringan dan bahkan organ. Penggunaan krioprotektan pada beberapa penelitian untuk vitrifikasi embrio sapi, blastosit tikus dan manusia adalah Ethylene Glycol (EG) 40 % dengan penambahan sucrose dan Bovine Serum Albumin (BSA) atau Human Serum Albumin (HSA) (Lopatarova *et al*, 2002; Rayos *et al*, 1994; Zhu *et al*, 1996; Zhu *et al*, 1993; Trounson *et al*, 1999).

Pada awal penelitian ini dilaksanakan, krioprotektan yang digunakan untuk vitrifikasi spermatozoa sama dengan krioprotektan untuk vitrifikasi yang telah disebutkan diatas yaitu Ethylene Glycol 40 % + Sucrose 0,3 M + HSA 6 %. Hasil yang didapatkan setelah disimpan beku dan dicairkan kembali, pada motilitas dan viabilitas spermatozoa, terjadi penurunan mendekati 100 % dibandingkan dengan hasil pemeriksaan

sebelum pembekuan. Ketahanan hidup dan motilitas spermatozoa hanya dapat dipertahankan sampai pada titik batas suhu kritis (-60°C), setelah melewati suhu kritis spermatozoa sulit untuk mempertahankan kemampuan hidupnya (dapat dilihat pada tabel 5.1.2. sampai dengan 5.1.13). Kegagalan vitrifikasi dengan menggunakan krioprotektan Ethylene Glycol (EG) 40 %, mungkin disebabkan karena konsentrasi EG yang pekat mengakibatkan toksik pada spermatozoa. Penambahan Sucrose (0,3 M) yang pekat mengakibatkan tekanan osmotik meningkat lebih tinggi dan cairan intraseluler lebih cepat keluar ke ekstraseluler. Sitoplasma yang dikandung dalam intraseluler spermatozoa sangat sedikit (Barrat, 1995) sehingga dengan penarikan air intraseluler yang cepat mengakibatkan spermatozoa mengalami stres osmotik. Konsentrasi EG yang pekat mengakibatkan toksik pada spermatozoa, walaupun efek toksik tersebut dapat dikurangi dengan cara menggabungkan dua krioprotektan. Penambahan bahan tambahan molekuler seperti sucrose dan trehalose tidak dapat melewati membran sel tetapi secara signifikan dapat mengurangi toksisitas EG dengan menurunkan konsentrasi yang diperlukan untuk kriopreservasi yang dilakukan pada oosit dan embrio manusia secara efektif. Sucrose juga bertindak sebagai *buffer* osmotik yang mengurangi tekanan osmotik yang disebabkan dilusi krioprotektan setelah kriopreservasi. Tetapi penambahan sucrose (BM = 342) yang digunakan pada konsentrasi yang pekat dapat mengakibatkan kerusakan osmotik yang berat dan dapat menambah efek toksisitas (Isachenco *et al*, 2003).

Ternyata untuk simpan beku spermatozoa dengan metode vitrifikasi tidak dibutuhkan konsentrasi yang pekat. Sebuah dogma yang telah dikembangkan bahwa vitrifikasi hanya dapat dicapai dengan menggunakan konsentrasi pekat dari kombinasi krioprotektan yang digunakan (Fahy, 1988), ternyata tidak berlaku untuk spermatozoa. Seperti juga yang telah dikatakan Fahy (1984) bahwa krioprotektan dengan konsentrasi yang pekat dapat mengakibatkan terjadinya perubahan biokimia dan kerusakan osmotik yang bersifat lethal (disadur dari Isachenko *et al*, 2003).

Pada penelitian ini, kriopreservasi dilakukan dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi dengan menggunakan sperma segar yang normozoospermia. Krioprotektan yang digunakan adalah Glycerol 15% + HEPES + HSA 0,4 % (*Medium freeze, fertipro, Belgia*). Penggunaan glycerol dengan konsentrasi 15 % telah umum dipergunakan untuk kriopreservasi spermatozoa pada hewan (Graham & Crabo, 1978), seperti juga penelitian yang dilakukan oleh Donnelly *et al* (2001) pada spermatozoa manusia.

Menurut Supriatna & Pasaribu (1992) penggunaan krioprotektan glycerol, untuk mendapatkan daya proteksi yang maksimal terhadap sel yang dibekukan perlu memperhatikan konsentrasinya, cara pemberian, lamanya waktu ekuilibrasi dan temperatur ekuilibrasinya. Pemberian glycerol dilakukan sebelum pembekuan dan lama waktu untuk ekuilibrasi selama 15 menit pada suhu ruangan sesuai dengan anjuran Matheson *et al* (Graham & Crabo).

Hasil yang didapatkan pada morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin tidak berbeda ($p > 0,05$) antara simpan beku dengan metode konvensional maupun dengan metode vitrifikasi. Glycerol sebagai krioprotektan intraseluler yang berperan dalam mekanisme kriopreservasi dengan tiga gugus hidroksil yang dimilikinya mempunyai kemampuan pengikatan air yang kuat, sehingga mencegah akumulasi H_2O dan mencegah kristalisasi pada daerah titik beku larutan sehingga dapat melindungi spermatozoa terhadap pembentukan kristal es intraseluler (Salisbury dan Van Denmark, 1985).

Pada penelitian ini terjadi penurunan morfologi normal, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin pada spermatozoa setelah dilakukan pembekuan baik dengan metode konvensional maupun dengan metode vitrifikasi dibandingkan dengan hasil pemeriksaan awal sebelum pembekuan.

Bentuk normal dari morfologi spermatozoa menurun menjadi 44,50 % setelah kriopreservasi dengan metode konvensional dan menurun menjadi 45,12% dengan metode vitrifikasi dibandingkan dengan hasil pemeriksaan awal sebelum pembekuan. Penurunan morfologi normal pada spermatozoa setelah dikriopreservasi baik dengan metode konvensional maupun dengan metode vitrifikasi mungkin dapat disebabkan karena terjadinya efek osmotik pada perubahan dari beku menjadi cair, sehingga mengganggu bentuk atau ukuran spermatozoa yang dapat terjadi pada kepala, leher maupun ekor spermatozoa. Hanya sedikit yang diketahui berkenaan dengan perubahan-perubahan morfologi

pada sel sperma manusia setelah kriopreservasi, namun penelitian yang dilakukan oleh Pedersen & Leftech menunjukkan dengan melalui elektromikroskopis bahwa terlihat adanya pembengkakan pada sel atau akrosom setelah kriopreservasi (Graham & Crabo, 1978).

Motilitas merupakan indikator penting untuk menentukan kualitas sperma setelah pembekuan (Goyal *et al*, 1996). Efek merusak yang paling sering terjadi dari kriopreservasi pada spermatozoa manusia adalah reduksi motilitas (Crister *et al*, 1988; Englert, 1989; Yoshida *et al*, 1990 disadur Donelly, 2001). Motilitas spermatozoa dapat menurun sebanyak 50 % akibat kriopreservasi dengan catatan persentasi pemulihan 43 % yang mengindikasikan penurunan motilitas sebesar 60 % (Keel *et al*, 1987).

Motilitas spermatozoa pada penelitian ini, setelah mengalami kriopreservasi dengan metode konvensional menurun sebesar 57,16 % dan dengan metode vitrifikasi menurun sebesar 57,89 % dari motilitas awal yang diukur sebelum pembekuan. Penurunan motilitas dapat terjadi karena kerusakan seluler yang akan diikuti dengan kerusakan membran yang disebabkan oleh pembentukan kristal es intraseluler selama pembekuan yang dilakukan dengan cepat, atau dapat juga karena efek osmotik atau tekanan mekanikal dari es ekstraseluler selama pembekuan lambat (Mossad *et al*, 1994).

Kerusakan membran yang terjadi pada kriopreservasi dapat terjadi pada membran plasma, membran akrosom bagian luar, membran akrosom bagian dalam dan membran nukleus spermatozoa. Kerusakan

membran plasma berkaitan dengan gangguan fungsi mitokhondria sehingga motilitas spermatozoa terganggu. Kerusakan pada membran mitokhondria dapat menghentikan proses pembentukan energi dan berpotensi untuk kematian sel (Henry *et al*, 1993). Kerusakan ini dapat terjadi karena terbentuknya kristal es intraseluler. Pada penelitian yang dilakukan Henry *et al* (1993), motilitas ketahanan membran dan fungsi mitokhondria menunjukkan pola kerusakan yang sama pada pembekuan-pencairan yang berbeda.

Kerusakan membran plasma spermatozoa menyebabkan gangguan pada metabolisme sel. Berkurangnya metabolisme akan menyebabkan berkurangnya energi yang dihasilkan, dan akan menurunkan motilitas. Sebab selama metabolisme, terjadi perombakan ATP dalam selubung mitokhondria yang menghasilkan energi untuk pergerakan spermatozoa dan diaktifkan oleh enzim-enzim tertentu sehingga ikatan fosfat pertama yang mengandung banyak energi akan terurai. Energi yang dilepas kemudian dapat digunakan sebagai energi mekanik (motilitas) atau energi kimiawi atau sewaktu-waktu dapat dilepas sebagai panas bila tidak digunakan. Apabila senyawa fosfat sebagai energi habis, maka kontraksi fibril-fibril kontraktile spermatozoa akan terhenti dan spermatozoa tidak bergerak (Toilehere, 1985; Salisbury & Van Denmark, 1985).

Pada proses kriopreservasi, viabilitas spermatozoa menurun seperti motilitasnya, tetapi jika dibandingkan dengan persentase motilitas, terlihat persentase hidup lebih tinggi. Viabilitas pada penelitian ini setelah pencairan menurun 52,93 % pada metode konvensional dan 57,53 %

pada metode vitrifikasi dibandingkan dengan viabilitas pada pemeriksaan awal. Ini menunjukkan bahwa banyak diantara spermatozoa yang masih hidup namun tidak motil atau hanya bergerak secara abnormal. Diduga penurunan viabilitas spermatozoa setelah kriopreservasi menurun disebabkan karena terjadi *cold shock* pada saat pembekuan dan kerusakan-kerusakan lain yang menyertai pada saat proses pembekuan dan pencairan.

Pada kriopreservasi baik dilakukan dengan metode konvensional maupun dengan metode vitrifikasi pada penelitian ini, kondensasi kromatin menurun walaupun penerunannya tidak sebesar motilitas dan viabilitas spermatozoa. Penurunan kondensasi kromatin sebanyak 8,64 % pada metode konvensional dan 4,43 % pada metode vitrifikasi dibandingkan dengan kondensasi kromatin sebelum dilakukan kriopreservasi (awal). Penelitian yang dilakukan Hammadeh *et al* (1999) menunjukkan bahwa krioprservasi menyebabkan kerusakan yang signifikan pada kondensasi spermatozoa. Penurunan kondensasi kromatin mungkin terjadi karena pengaruh pemilihan krioprotektan yang digunakan.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Isachenko *et al* (2003) adalah vitrifikasi spermatozoa tanpa menggunakan krioprotektan, hasil yang didapatkan cukup baik. Pada penelitian ini telah dicoba dilakukan simpan beku spermatozoa dengan metode vitrifikasi tanpa menggunakan krioprotektan, hasilnya sama dengan simpan beku yang menggunakan krioprotektan pada medium *freeze Fertipro* (Belgia).

Keberhasilan vitrifikasi tanpa krioprotektan ini menurut Isachenko (2003) berkaitan dengan dua variabel dasar yaitu ukuran sel dan konsentrasi makromolekuler yang dapat melarut. Dehidrasi intraseluler yang dilakukan dengan cepat ternyata tidak diperlukan oleh spermatozoa, karena ukuran kepala spermatozoa manusia lebih kecil dari kepala spermatozoa species hewan dan juga lebih kecil dari embrio manusia. Kepala spermatozoa manusia mempunyai kriostabilitas yang paling tinggi dibandingkan species lain. Ini berarti nukleasi intraseluler diikuti pertumbuhan kristal es selama pembekuan atau rekristalisasi selama pencairan cenderung tidak mungkin terjadi (Isachenko *et al*, 2003).

Secara umum sel terdiri dari konsentrasi protein yang pekat yang dapat membantu dalam vitrifikasi. Dengan demikian konsentrasi krioprotektan yang lebih pekat diperlukan untuk vitrifikasi ekstraseluler dari pada untuk vitrifikasi intraseluler. Fahy (1974) telah membuktikan bahwa pada kondisi tertentu ^{model benak} polymer dapat mengurangi konsentrasi larutan sebanyak 7%, dan dapat mengurangi 24% pada saat dikombinasikan dengan cara meningkatkan tekanan hidrostatik. Penelitian pertama yang mengevaluasi efek-efek yang berpotensi menguntungkan dengan penambahan larutan makromolekul pada larutan vitrifikasi untuk membantu proses vitrifikasi tersebut telah diteliti oleh Kasai *et al* (1990). Polymer dapat melindungi embrio terhadap kerusakan yang disebabkan oleh krioprotektan dengan mengurangi tekanan mekanik yang terjadi selama kriopreservasi (Dumolin *et al*, 1994), dan dapat mengurangi jumlah krioprotektan yang diperlukan untuk mencapai vitrifikasi itu sendiri

(Shaw *et al*, 1997). Selain itu polymer juga dapat mempengaruhi viskositas larutan vitrifikasi, menurunkan toksisitas krioprotektan dengan konsentrasi yang lebih rendah dan dapat membentuk *matrix encapsulating* sel yang viscous serta dapat mencegah kristalisasi selama pembekuan dan pencairan (Kasai *et al*, 1990). O'Neil *et al* (1997) melihat bahwa penambahan krioprotektan polyethylene glycol dapat memperbaiki viabilitas oosit dan menurunkan larutan vitrifikasi. Gao *et al* (1997) dan konsultasi pribadi yang dilakukan Isachenko pada Stuart Meyers, menyatakan bahwa jumlah makromolekul dengan BM yang besar dan polymer yang larut dalam cytosol yang diperkirakan dari volume sel secara osmotik yang tidak aktif sekitar 20-30% untuk embrio dan oosit, sedangkan untuk spermatozoa 45-77%. Ini berarti jumlah air yang dikandung dalam beberapa struktur makromolekul seperti DNA, histon, hyaluronidase pada spermatozoa yang secara osmotik tidak aktif lebih tinggi pada spermatozoa. Akibatnya jumlah komponen dengan berat molekul yang tinggi pada spermatozoa dapat menjadi 6-16 kali lebih tinggi dari pada embrio. Hal ini dapat meningkatkan viskositas dan tercapainya vitrifikasi pada cytosol intraseluler untuk spermatozoa, sedangkan untuk embrio kemungkinan terjadinya pembentukan kristal es selama pembekuan dan pencairan lebih tinggi. Komponen intraseluler dapat meningkatkan survival spermatozoa. Bukti tidak langsung bahwa komponen intraseluler spermatozoa dapat bertindak sebagai krioprotektan adalah spermatozoa tikus secara osmotik rentan, (Katkov *et al*, 1998; Kusakabe *et al*, 2001), dapat dibekukan tanpa krioprotektan, karena

adanya susu skim yang kaya protein, gula dan rafinose yang digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler (Yokohama *et al*, 1990; Koshitomo *et al*, 2000 disadur dari Isachenko *et al*, 2003).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Simpan beku dengan metode vitrifikasi dapat digunakan sebagai alternatif untuk kriopreservasi spermatozoa, karena morfologi, motilitas, viabilitas dan kondensasi kromatin pasca pencairan tidak berbeda dibandingkan dengan metode konvensional.
- 2, Metode vitrifikasi spermatozoa tidak memerlukan krioprotektan yang berkonsentrasi tinggi seperti pada vitrifikasi oosit, embrio ataupun sel besar lainnya.
3. Ethylen Glycol tidak dapat digunakan sebagai krioprotektan untuk vitrifikasi spermatozoa.

7.2. SARAN

1. Untuk penyimpanan spermatozoa sebaiknya menggunakan metode vitrifikasi karena waktu yang dibutuhkan lebih singkat dan biaya yang dibutuhkan lebih rendah.
2. Pada proses Vitrifikasi spermatozoa dapat menggunakan krioprotektan Glycerol 15 % yang ditambahkan Human Serum Albumin 0,4 % , selain itu simpan beku spermatozoa dapat juga dilakukan dengan metode vitrifikasi tanpa menggunakan krioprotektan.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Allahbadia G., (2002). Outline : Human Semen Banking Where Are We Today?. J. Bombay Hospital, Internet, 8 Jan.
- Barratt C.L.R. (1995). Spermatogenesis. *In* J.G. Grudzinskas and J.L. Yovich (Eds), *Gametes – The Spermatozoon*, University Press, 13, 250-267.
- Critser J.K., Arenson B.W., Aaker D.V., (1987) Cryopreservation of human spermatozoa. Post - thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril*, 47,980-984.
- Critser J.K., Husebenda A.R., Aaker D.V. (1988). Cryopreservation of human spermatozoa. Effects of holdoing procedure and seeding on motility, fertilizability and acrosome reaction. *Fertil Steril*, 47,656-663.
- Cummins J.M.,Jequier A.M., Kan R. (1994). Molecular biology of human meal infertility linked with aging, mitochondrial genetic and oxidative stress. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 345-362.
- Curry M.R. and Watson P.F. (1995). Sperm structure and function. *In* J.G. Grudzinskas and J.L. Yovich (Eds), *Gametes – The Spermatozoon*, University Press, Cambridge, 3, 45-69.
- Dadoune JP and Alfonsi M.F. (1986). Ultrastructural and Cytochemical changes of The Components of Human Spermatids and Spermatozoa. *Gamete Res.* 14, 33-46.
- Dadoune J.P., Mayaux M.J. and Guihard M.L. – Moscato (1988). Correlation Between Defects in Chromatin Condensation of Human Spermatozoa Stained by Aniline Blue and Semen Characteristic. *Andrologis*, 20 (3), 211-217.
- Devroey P., Silber S., Nagy Z., Liu J., Tournaye H., Joris H., Veryehen G. and Van Steirteghem A.C. (1995). Ongoing pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Human reprod.*, 10, 903-906.

- Donnelly E.T., Steele E.K., Mc Clure N. and Lewis S.E.M. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 16, 1191-1199.
- Englert Y., Delvigne A., Vekemans M. (1989). Is fresh or frozen semen to be use in *in-vitro* fertilization with donor sperm. *Fertil Steril*, 51, 661-664.
- Goltz J.S., Gardner T.K., Kanous K.S., Lindemann C.B. (1988). The interaction of pH and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate on activation of motility in Triton X-100 extracted bull sperm. *Biology Reproduction* 39, 129-1136.
- Goyal R.L., Tuli R.K., Georgie G.C. and Chand D. (1996). Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or sephadex filtration. *Theriogenologi*, 46, 679-686
- Graham E.F. and Crabo B.G., 1978. Some Methods of Freezing And Evaluating Human Spermatozoa. *In The Integrity of Frozen Spermatozoa*, National Academy of Sciences, Washington D.C., 274-304.
- Grizard G., Chevalier V., Griveau J.F., L'e Lannou D. and Boucher D. (1999). Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *Int. J. Androl.*, 22:3, 190-196.
- Hafes E.S.E. (1980). The semen. *Human Reprod.* Hafes E.S.E. (Eds), *Conseption and Contraception*. 2nd, Detroid, Michigan, 91-122.
- Hammadeh M.E., Askari A.S., Georg T., Rosenbaum P. and Schmidt W. (1999). Effect of freeze-thawing procedure on choratin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int. J. Androl.*, 22:3, 155-162.
- Henry M.A., Noiles E.E., Gao D., Mazur P. and Critser J.R. (1998). Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling

- rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil and Steril*, 60:15, 911-917.
- Hong C.T., Chiang B.N., Turner P. (1984). Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancett ii*, 1449-1451.
- Hozumi T. (2001). *Reproductive Biology and Biotechnology*. Japan International Cooperation Agency. Indonesia. P.47.
- Hurret J.L. (1986). Nuclear Chromatin Decondensation of Human Sperm. A. Review. *Arch. Androl.* 16, 97-109.
- Isachenko E., Isachenko V., Katkov I.I., Dessole S., Nawroth F. (2003). Vitricification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectans: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine*, 6, 2, 191-200. Internet, 10 Jan.
- Kerr J.B. (1992). Functional cytology of the human testis. *In* Burger H. (Eds), *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, London, Bailliere Tindall, 6:2, 235-250.
- Kliesch S., Kamischke A. and Nieschlag E., (1997). Cryopreservation of Human Semen. *In* E. Nieschlag and H.M. Behre (Eds), *Andrology, Male Reproduction Health and Dysfunction*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Chapter 18, 349-356.
- Kobayashi K., Nagashima H., Yamakawa H., Kato Y. and Ogawa S. (1990). The Survival of Whole and Bisected Morulae after Cryopreservation by the Vitricification Method. *Theriogenology*, 33, 777-788.
- Kolb B.A. and Jeyendran R.S. (1997). Outline : Evaluation of $\leq$ Cryopreserved $\geq$ Sperm by its Ability to Maintain Quality in Media With and Without Glycerol to Predict Fertility. Internet, 8 Jan, 2002.
- Lapatarova M., Cech S., Havlicek V., Holy L. (2002). Effect of Vitricification in Open Pulled Straws on Survival of Bovine Embryos from Superovulated cows. *ACTA VET, BRNO*, 71, 93-99.
- Marshburn P.B., Mc Intire D., Caur B.R. and Byrd W. (1992). Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and

- their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 58:1, 179-186.
- Moore H.D.M. (1995). Post – Testicular sperm maturation and transport in the excurrent ducts. *In* J.G. Grudzinskas and J.L. Yovich (Eds), *Gametes – The Spermatozoon*, University Press, Cambridge, 7, 140-155.
- Niemann H. (1991). Cryopreservation of Ova and Embryo from Livestock : Current Status and Research Needs. *Theriogenology*, 35, 109-124.
- Nolan J.P. and Hammerstedt (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *The FASEB J.* 11, 670-681.
- Panayota N., Zarmakaupis-Zavos M.D. (1998). Occurrence of osmotic shock in human spermatozoa: its effects on the qualitative measurements of frozen-thawed spermatozoa. *J. Middle East Fertility Society*, vol.3, no:1.
- Park J.E. and Graham J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membrane. *Theriogenology* 38, 209-22.
- Pieterosono O. (1978). *Pedoman Analisa Sperma*. Laboratorium Biomedik Sub Seksi Andrologi dan Genetika Medik Fakultas UNAIR.
- Polcz T.B., Stronk J.B. and Huszar G.B. (1996). Outline : Repeated Cryopreservation of Ejaculated Human Spermatozoa: Recovery and Maintenance of Sperm Motility and Viability..Internet, 8 Jan, 2002.
- Rayos A.A., Takahashi Y., Hishinuma M. and Kanagawa H. (1994). Quick freezing of unfertilized mouse oocyte using Ethylene Glycol with sucrose or trehalose. *J. Reprod. and Fertility* 100,123-129.
- Quinn P. (1995). Cryopreservation of Embryos and Oocyte. *In* William R. Keye, et al (Eds), *Infertility Evaluation and Treatment*, WB Saunders Company, USA, 821-883.
- Salisbury G.W. and Van Denmark N.I. (1995). *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Alih bahasa : R. Djanuar, Gajah Mada University Press.

- Soehadi K. (1987). Faal Sistim Reproduksi Pria. *In* Koentjoro S. dan Hudi W. (Eds), *Kursus Penyegar Spermatologi II*, Surabaya, FK UNAIR, 9-30.
- Supriatna I. dan Pasaribu R.H. (1992). *In Vitro Fertilisasi, Transfer embrio*, Depdikbud Dirjen Dikti IPB, 140-143.
- Terqueem, A and Dadoune JP (1983). Anilin blue staining of Human Spermatozoa Chromatine - Evaluation of Nuclear Maturation in the Sperm Cell. *J. Androl* (Eds) , 249-252.
- Tournaye H., Janssens R., Devroey P., Van steirteghem A. (1994). The influence of pentoxifylline on motility and viability of spermatozoa from normozoospermic semen samples. *Int J. Androl* 17, 1-8.
- Trounson A., Kuleshova L. and Gianaroli L. (1999). What Can We Expect from Thawing Gametes. *The First Congress On: Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility Prague, Czech Republic*, 1-4.
- Verheyen G., Platinex I. and Van Steirteghem A. (1993). Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution / washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum. Reprod.*, 8:10, 1678-1684.
- Wetzels A.M.M. (1996). Cryopreservation / theory. *In* M. Bras et al (Eds), *IVF Lab. Laboratory Aspects o In Vitro Fertilization*. N.V. Organon, Netherlands, 229-245.
- WHO (1992). *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical mucus Interaction*, 3rd , New York: Cambridge University Press.
- Winarso H. dan Hinting A. (1999). *Simpan Beku Sperma Manusia*. Surabaya. Post Graduate Course Penatalaksanaan Pria dan Analisa Semen, F.K. Unair, 1-3.
- Zavos P.M., Correa J.R., Sofikitis N., Kofinas G.D. and Zarmakoupis P.N. (1995). A Method of Short-Term Cryostorage and Selection of Viable Sperm for Use in the Various Assisted Reproductive Techniques. *J. Tohoku, Exp. Med.*, 176, 75-81.

- Zavos P.M., Correa J.R. and Zarmakoupis-Zavos P.N. (1998). Evaluation of techniques for the cryopreservation of washed spermatozoa: comparisons between Ham's F-10 and TEST-yolk media. *J. Tohoku, Exp. Med.*, 184:4, 277-284.
- Zhu S.E., Kasai M., Otoge H., Sakurai T. Machida T. (1993). Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol- based solution. *J. Reprod. and Fertility* 98, 139-143.
- Zhu S.E., Sakurai T., Edashige K., Machida T. and Kasai M. (1996). *J. Reprod. and Fertility* 107, 37-42.

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Data hasil pemeriksaan Morfologi, Motilitas, Viabilitas dan Kondensasi Kromatin spermatozoa manusia pada awal, setelah disimpan beku dengan metode Konvensional dan metode Vitrifikasi dengan menggunakan medium *freeze* Fertipro (Belgi).

Px	AWAL				KONVENSIONAL				VITRIFIKASI			
	Mrf	Motil	Viab	KK	Mrf	Motil	Viab	KK	Mrf	Motil	Viab	KK
Pria 1 29 thn	30	a: 7 b: 60	H: 69 M: 31	P: 87,3 B: 5,2 PB: 7,5	14	a: 3 b: 32	H: 41 M: 59	P: 78,5 B: 8,3 PB: 13,2	16	a: 2 b: 44	H: 49 M: 51	P: 82,1 B: 6,2 PB: 11,7
Pria 2 29 thn	36	a: 6 b: 70	H: 84 M: 16	P: 77,4 B: 8,1 PB: 14,5	24	a: 10 b: 45	H: 58 M: 42	P: 71,6 B: 16,2 PB: 12,2	20	a: 4 b: 43	H: 54 M: 46	P: 70,2 B: 10,4 PB: 19,2
Pria 3 29 thn	34	a: 4 b: 63	H: 80 M: 20	P: 89,3 B: 4,1 PB: 6,6	20	a: 2 b: 15	H: 22 M: 78	P: 75,1 B: 5 PB: 19,9	22	a: 1 b: 28	H: 35 M: 65	P: 87 B: 5,1 PB: 7,9
Pria 4 32 thn	30	a: 14 b: 49	H: 72 M: 28	P: 70,6 B: 9,8 PB: 19,6	22	a: 2 b: 14	H: 36 M: 64	P: 68,3 B: 12 PB: 19,7	22	a: 0 b: 16	H: 41 M: 59	P: 60 B: 14,5 PB: 25,5
Pria 5 30 thn	30	a: 2 b: 63	H: 80 M: 20	P: 86,3 B: 10,1 PB: 3,6	14	a: 1 b: 18	H: 20 M: 80	P: 73,2 B: 18,7 PB: 8,1	16	a: 0 b: 20	H: 22 M: 78	P: 80 B: 12,4 PB: 7,6
Pria 6 29 thn	32	a: 4 b: 73	H: 75 M: 25	P: 83,6 B: 8,2 PB: 8,2	20	a: 2 b: 41	H: 46 M: 64	P: 82,4 B: 9,3 PB: 8,3	18	a: 0 b: 37	H: 38 M: 62	P: 80,6 B: 10,3 PB: 9,1
Pria 7 29 thn	38	a: 7 b: 68	H: 85 M: 15	P: 84,7 B: 4,8 PB: 10,5	16	a: 0 b: 29	H: 40 M: 60	P: 70,6 B: 13 PB: 16,4	14	a: 1 b: 26	H: 34 M: 66	P: 68,2 B: 21,4 PB: 10,4
Pria 8 33 thn	32	a: 12 b: 64	H: 84 M: 16	P: 76,6 B: 14,4 PB: 9	18	a: 7 b: 22	H: 38 M: 62	P: 71,1 B: 20,7 PB: 8,2	20	a: 4 b: 25	H: 36 M: 64	P: 73,3 B: 14,2 PB: 12,5
Pria 9 33 thn	36	a: 10 b: 52	H: 77 M: 23	P: 74,4 B: 7,4 PB: 18,2	18	a: 0 b: 25	H: 34 M: 66	P: 69,9 B: 12,6 PB: 17,5	18	a: 2 b: 16	H: 23 M: 77	P: 68,4 B: 15,1 PB: 16,5
Pria 10 30 thn	30	a: 2 b: 64	H: 76 M: 24	P: 62,4 B: 20 PB: 17,6	16	a: 0 b: 25	H: 32 M: 68	P: 63,4 B: 21,5 PB: 15,1	14	a: 0 b: 19	H: 19 M: 81	P: 57,7 B: 25,5 PB: 16,8

KETERANGAN:

Mrf : Morfologi

Motil: Motilitas

a : sangat baik B

b : baik

Viab : Viabilitas

H :Hidup

M : Mati

KK : Kondensasi\ Kromatin

P : Putih

B : Biru

PB : Putih & Biru

Lampiran 2 : Hasil simpan beku spermatozoa dengan metode konvensional menggunakan medium *freeze* Fertipro dan dengan metode Vitrifikasi yang menggunakan krioprotektan berbeda konsentrasi dan penurunan suhu berbeda.

Nama	Pembekuan	Metode	Krioprotektan	Morf (%)	Mot (%)	Viab (%)	KK (%)
Pria 33 thn Tj	-	Awal	-	40	a: 0 b: 60	H: 80 M: 20	P: 90 B: 4,8 PB: 5,2
	- 196°C	Konven	Fertipro: Gliserol 15% + HEPES + HSA 0,4 %	28	a: 0 b: 9	H: 16 M: 84	P: 74,9 B: 16,8 PB: 8,3
	- 196°C	Vitrif	Etilen Glikol 40 % + Sukrosa 0,3 M + HSA 6 %	10	a: 0 b: 0	H: 1 M: 99	P: 66,4 B: 17,5 PB: 16,1
	4° C	-		-	a: 0 b: 20	H: 51 M: 49	-
	- 20° C	-		-	A: 0 b: 21	H: 40 M: 60	-
	- 40° C	-		-	a: 0 b: 0	H: 2 M: 98	-
	- 60° C	-		-	a: 0 b: 0	H: 3 M: 97	-
	- 80°C	-		-	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	-
	- 196°C	Vitrif	Fertipro	28	a: 0 b: 10	H: 14 M: 86	P: 78 B: 7,3 PB: 14,7
	- 196°C	Vitrif	Etilen Glikol 40 % + Sukrosa 0,2 M + HSA 6 %	12	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	P: 66,2 B: 17,1 PB: 16,7
	4° C	-		-	a: 0 b: 26	H: 57 M: 43	-
	- 20° C	-		-	a: 0 b: 22	H: 44 M: 56	-
	- 40° C	-		-	a: 0 b: 7	H: 12 M: 88	-
	- 60° C	-		-	a: 0 b: 0	H: 5 M: 95	-
	- 80°C	-		-	a: 0 b: 0	H: 1 M: 0	-

Nama	Pembekuan	Metode	Krioprotektan	Morf (%)	Mot (%)	Viab (%)	KK (%)
Pria 32 thn SA	-	Awal	-	36	a:10 b:30	H: 77 M: 23	P: 82,6 B: 6,2 PB: 11,2
	- 196°C	Konven	Fertipro	18	a: 0 b: 10	H: 16 M: 84	P: 65,3 B: 17,9 PB: 16,8
	- 196°C	Vitrif	Etilen Glikol 40% + Sukrosa 0,1 M + HAS 6 %	10	a: 0 b: 0	H: 1 M: 99	P: 70 B: 15,8 PB: 14,2
	4° C	-		-	a: 0 b: 14	H: 20 M: 80	-
	- 20° C	-		-	a: 0 b: 8	H: 9 M: 91	-
	- 40° C	-		-	a: 0 b: 3	H: 18 M: 82	-
	- 60° C	-		-	a: 0 b: 1	H: 22 M: 78	-
	- 80° C	-		-	a: 0 b: 2	H: 10 M: 90	-
	- 196°C	Vitrif	Etilen Glikol 30 % + Sukrosa 0,1 M + HAS 9 %	12	a: 0 b: 0	H: 2 M: 98	P: 69,2 B: 23, 1 PB: 7, 7
	4° C	-		-	a: 0 b: 9	H: 34 M: 66	-
	- 20° C	-		-	a: 0 b: 7	H: 36 M: 64	-
	- 40° C	-		-	a: 0 b: 2	H: 10 M: 90	-
	- 60° C	-		-	a: 0 b: 6	H: 19 M: 81	-
	- 80° C	-		-	a: 0 b: 6	H: 19 M: 81	-

Nama	Pembekuan	Metode	Krioprotektan	Morf (%)	Mot (%)	Viab (%)	KK (%)
Pria RM	-	Awal	-	30	a: 4 b: 74	H: 78 M: 22	P: 84,1 B: 9,9 PB: 6
	- 196°C	Koven	Fertipro	14	a: 1 b: 64	H: 68 M: 32	P: 77,6 B: 15,3 PB: 6,1
	- 196°C	Vitrif	Etilen Glikol 30 % + Sukrosa 0,2 M + HAS 6 %	10	a: 0 b: 0	H: 1 M: 99	P: 71,3 B: 13,3 PB: 15,4
	4° C	-		-	a: 0 b: 38	H: 55 M: 45	-
	- 20° C	-		-	a: 0 b: 24	H: 38 M: 62	-
	- 40° C	-		-	a: 1 b: 28	H: 37 M: 63	-
	- 60° C	-		-	a: 0 b: 2	H: 3 M: 97	-
Pria JKS	-	Awal	-	32	a: 15 b: 45	H: 77 M: 34	P: 84 B: 6,7 PB: 9,3
	- 196°C	Konven	Fertipro	20	a: 6 b: 21	H: 27 M: 73	P: 80,3 B: 8 PB: 11,7
	- 196°C	Vitrif	Etilen Glikol 30 % + Sukrosa 0,3 M + HAS 6 %	8	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	P: 70 B: 13,9 PB: 16,1
	4° C	-		-	a: 0 b: 9	H: 34 M: 66	-
	- 20° C	-		-	a: 0 b: 7	H: 36 M: 64	-
	- 40° C	-		-	a: 0 b: 2	H: 10 M: 90	-
	- 60° C	-		-	a: 0 b: 6	H: 19 B: 81	-
	- 80° C	-		-	a: 0 b: 1	H: 8 M: 92	-

Simpan beku dengan metode vitrifikasi menggunakan krioprotektan berbeda konsentrasi dan simpan beku dengan metode Konvensional menggunakan medium *freezr* Fertipro.

Nama	Pembekuan	Metode	Krioprotektan	Morf (%)	Mot (%)	Viab (%)	KK (%)
Pria HR	-	Awal	-	34	a: 9 b: 51	H: 68 M: 32	P: 88,7 B: 6 PB: 5,3
		Vitrif	Etilen Glikol 20 % + Sukrosa 0,1 M + HAS 6 %	8	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	P: 72,1 B: 11,4 PB: 16,5
		Vitrif	Etilen Glikol 20 % + Sukrosa 0,2 M + HAS 6 %	8	a: 0 b: 0	H: 1 M: 99	P: 69,8 B: 10,7 PB: 19,5
		Vitrif	Etilen Glikol 20 % + Sukrosa 0,3 M + HAS 6 %	6	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	P: 68,2 B: 12,8 PB: 19
		Vitrifi	Etilen Glikol 10 % + Sukrosa 0,1 M + HAS 6 %	10	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	P: 73,3 B: 13 PB: 13,7
		Vitrif	Etilen Glikol 10 % + Sukrosa 0,2 M + HAS 6 %	8	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	P: 71,4 B: 14,4 PB: 14,2
		Vitrif	Etilen Glikol 10 % + Sukrosa 0,3 M + HAS 6 %	8	a: 0 b: 0	H: 0 M: 100	P: 70,2 B: 12,2 PB: 17,6
		Konven	Fertriopro	18	a: 2 b: 24	H: 28 M: 72	P: 81,3 B: 8,2 PB: 10,5

Penurunan suhu dengan krioprotektan yang berbeda.

Nama	Krioprotektan	Suhu (° C)	Mot (%)		Viab (%)	
			A	P	A	P
Pria 1	EG 20 % + Sukrosa 0,3 M + HSA 6 %	4	56	10	60	30
		- 20		8		28
		- 40		3		20
		- 60		5		16
		- 80		2		3
	EG 20 % + Sukrosa 0,2 M + HAS 6 %	4		32		41
		- 20		28		34
		- 40		17		26
		- 60		10		18
		- 80		3		4
Pria 2	EG 20 % + Sukrosa 0,1 M + HAS 6 %	4	52	23	54	35
		- 20		20		28
		- 40		16		21
		- 60		16		20
		- 80		5		12
	EG 10 % + Sukrosa 0,3 M + HAS 6 %	4		15		25
		- 20		16		25
		- 40		12		18
		- 60		10		14
		- 80		6		8
Pria 3	EG 10 % + Sukrosa 0,2 M + HAS 6 %	4	50	34	52	39
		- 20		32		40
		- 40		26		32
		- 60		18		30
		- 80		12		15
	EG 10 % + Sukrosa 0,1 M + HSA 6 %	4		35		40
		- 20		30		38
		- 40		30		33
		- 60		22		32
		- 80		11		16

Keterangan :

Mot : Motilitas

A: Awal

Viab : Viabilitas

P : Pencairan

Lampiran 3 : Data hasil pemeriksaan Morfologi, Motilitas, Viabilitas dan Kondensasi Kromatin spermatozoa manusia pada awal, setelah simpan beku dengan metode Vitrifikasi yang menggunakan krioprotektan yang telah dikemas dalam medium *freeze* (Fertipro, Belgi) dan Vitrifikasi tanpa krioprotektan,

Nama	Metode	Krioprotektan	Morfologi (%)	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	Kondensasi kromatin (%)
Pria AFD	Awal	-	32	a: 0 b: 66	H: 84 M: 16	P: 90,5 B: 5,2 PB: 4,3
	Konven	Fertipro	26	a: 1 b: 32	H: 38 M: 62	P: 80,4 B: 6,3 PB: 13,4
	Vitrif	Fertipro	24	a: 1 b: 28	H: 32 M: 68	P: 74 B: 10,2 PB: 15,4
	Vitrif	-	24	a: 1 b: 29	H: 33 M: 77	P: 86,6 B: 5,8 PB: 7,6
Pria ES	Awal	-	30	a: 2 b: 48	H: 52 M: 48	P: 88,1 B: 6,2 PB: 5,7
	Konven	Fertipro	26	a: 1 b: 24	H: 28 M: 72	P: 80,4 B: 6,2 PB: 13,4
	Vitrif	Fertipro	16	a: 1 b: 6	H: 8 M: 92	P: 74 B: 10,2 PB: 15,4
	Vitrif	-	20	a: 0 b: 7	H: 8 M: 92	P: 87,6 B: 3,8 PB: 7,6
Pria SFD	Awal	-	32	a: 2 b: 50	H: 54 M: 46	P: 90 B: 4,6 PB: 5,4
	Konven	Fertipro	20	a: 0 b: 24	H: 24 M: 76	P: 82,2 B: 7,2 PB: 10,6
	Vitrif	Fertipro	18	a: 0 b: 18	H: 18 M: 82	P: 78,5 B: 9,8 PB: 11,7
	Vitrif	-	20	a: 0 b: 20	H: 21 M: 79	P: 80,4 B: 7,6 PB: 12

Lampiran 4 : Rerata nilai Morfologi, Motilitas, Viabilitas dan Kondensasi Kromatin Spermatozoa Manusia sebelum dan sesudah di kriopreservasi dengan metode Konvensional dan metode Vitrifikasi.

Means

Report

GRUP		MORFOL OGI	MOTILITAS	VIABILITAS	KOND KROMATIN
AWAL	RERATA	32,80	68,40	78,2000	79,2600
	SIM. BAKU	3,01	5,50	5,3707	8,5430
KONVENTION	RERATA	18,20	29,30	36,7000	72,4100
	SIM. BAKU	3,33	12,26	11,0358	5,3205
VITRIFIKASI	RERATA	18,00	28,80	33,1000	75,7500
	SIM. BAKU	2,98	11,31	12,5472	9,1114

Lampiran 5 : Tes Kenormalan Distribusi pada kelompok Awal (sebelum dilakukan kriopreservasi).

NPar Tests

GRUP = AWAL

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MORFOL OGI	MOTILITAS	VIABILITAS	KOND KROMATIN
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	32,80	68,40	78,2000	79,2600
	Std. Deviation	3,01	5,50	5,3707	8,5430
Most Extreme Differences	Absolute	,224	,300	,160	,194
	Positive	,224	,300	,103	,120
	Negative	-,176	-,185	-,160	-,194
Kolmogorov-Smirnov Z		,708	,950	,506	,614
Asymp. Sig. (2-tailed)		,698	,327	,960	,845

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = AWAL

Lampiran 6 : Tes Kenormalan Distribusi pada kelompok Konvensional.

GRUP = KONVENTION

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MORFOL OGI	MOTILITAS	VIABILITAS	KOND KROMATIN
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	18,20	29,30	36,7000	72,4100
	Std. Deviation	3,33	12,26	11,0358	5,3205
Most Extreme Differences	Absolute	,146	,210	,148	,161
	Positive	,146	,210	,148	,161
	Negative	-,106	-,139	-,135	-,120
Kolmogorov-Smirnov Z		,461	,663	,469	,508
Asymp. Sig. (2-tailed)		,984	,771	,980	,959

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = KONVENTION

Lampiran 7 : Tes Kenormalan Distribusi pada kelompok Vitrifikasi.

GRUP = VITRIFIKASI

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MORFOL OGI	MOTILITAS	VIABILITAS	KOND KROMATIN
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	18,00	28,80	33,1000	75,7500
	Std. Deviation	2,98	11,31	12,5472	9,1114
Most Extreme Differences	Absolute	,149	,193	,190	,180
	Positive	,149	,193	,190	,129
	Negative	-,149	-,136	-,129	-,180
Kolmogorov-Smirnov Z		,471	,610	,599	,568
Asymp. Sig. (2-tailed)		,980	,851	,865	,904

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = VITRIFIKASI

Lampiran 8 : Statistik Deskriptif dan Univariate Analysis pada Morfologi, Motilitas, Viabilitas dan Kondensasi Kromatin spermatozoa sebelum dan sesudah kriopreservasi dengan metode Konvensional dan metode Vitrifikasi

General Linear Model

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
GRUP 1	AWAL	10
2	KONVENTION	10
3	VITRIFIKASI	10

Descriptive Statistics

	GRUP	Mean	Std. Deviation	N
MORFOLOGI	AWAL	32,80	3,01	10
	KONVENTION	18,20	3,33	10
	VITRIFIKASI	18,00	2,98	10
	Total	23,00	7,66	30
MOTILITAS	AWAL	68,40	5,50	10
	KONVENTION	29,30	12,26	10
	VITRIFIKASI	28,80	11,31	10
	Total	42,17	21,25	30
VIABILITAS	AWAL	78,2000	5,3707	10
	KONVENTION	36,7000	11,0358	10
	VITRIFIKASI	33,1000	12,5472	10
	Total	49,3333	22,9968	30
KOND KROMATIN	AWAL	79,2600	8,5430	10
	KONVENTION	72,4100	5,3205	10
	VITRIFIKASI	75,7500	9,1114	10
	Total	75,8067	8,0803	30

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,995	1144,751 ^a	4,000	24,00	,000
	Wilks' Lambda	,005	1144,751 ^a	4,000	24,00	,000
	Hotelling's Trace	190,792	1144,751 ^a	4,000	24,00	,000
	Roy's Largest Root	190,792	1144,751 ^a	4,000	24,00	,000
GRUP	Pillai's Trace	,936	5,499	8,000	50,00	,000
	Wilks' Lambda	,111	12,037 ^a	8,000	48,00	,000
	Hotelling's Trace	7,615	21,893	8,000	46,00	,000
	Roy's Largest Root	7,559	47,245 ^b	4,000	25,00	,000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+GRUP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	MORFOLOGI	1440,800 ^a	2	720,400	74,467	,000
	MOTILITAS	10324,067 ^b	2	5162,033	50,205	,000
	VIABILITAS	12564,067 ^c	2	6282,033	61,175	,000
	KOND KROMATIN	234,661 ^d	2	117,330	1,910	,168
Intercept	MORFOLOGI	15870,000	1	15870,000	1640,467	,000
	MOTILITAS	53340,833	1	53340,833	518,786	,000
	VIABILITAS	73013,333	1	73013,333	711,015	,000
	KOND KROMATIN	172399,5	1	172399,5	2806,154	,000
GRUP	MORFOLOGI	1440,800	2	720,400	74,467	,000
	MOTILITAS	10324,067	2	5162,033	50,205	,000
	VIABILITAS	12564,067	2	6282,033	61,175	,000
	KOND KROMATIN	234,661	2	117,330	1,910	,168
Error	MORFOLOGI	261,200	27	9,674		
	MOTILITAS	2776,100	27	102,819		
	VIABILITAS	2772,600	27	102,689		
	KOND KROMATIN	1658,778	27	61,436		
Corrected Total	MORFOLOGI	1702,000	29			
	MOTILITAS	13100,167	29			
	VIABILITAS	15336,667	29			
	KOND KROMATIN	1893,439	29			

a. R Squared = ,847 (Adjusted R Squared = ,835)

b. R Squared = ,788 (Adjusted R Squared = ,772)

c. R Squared = ,819 (Adjusted R Squared = ,806)

d. R Squared = ,124 (Adjusted R Squared = ,059)

Estimated Marginal Means
GRUP

Estimates

Dependent Variable	GRUP	Mean	Std. Error
MORFOLOGI	AWAL	32,800	,984
	KONVENTION	18,200	,984
	VITRIFIKASI	18,000	,984
MOTILITAS	AWAL	68,400	3,207
	KONVENTION	29,300	3,207
	VITRIFIKASI	28,800	3,207
VIABILITAS	AWAL	78,200	3,205
	KONVENTION	36,700	3,205
	VITRIFIKASI	33,100	3,205
KOND KROMATIN	AWAL	79,260	2,479
	KONVENTION	72,410	2,479
	VITRIFIKASI	75,750	2,479

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
MORFOLOGI	AWAL	KONVENTION	14,600	1,391	,000
		VITRIFIKASI	14,800	1,391	,000
	KONVENTION	VITRIFIKASI	,200	1,391	,887
MOTILITAS	AWAL	KONVENTION	39,100	4,535	,000
		VITRIFIKASI	39,600	4,535	,000
	KONVENTION	VITRIFIKASI	,500	4,535	,913
VIABILITAS	AWAL	KONVENTION	41,500	4,532	,000
		VITRIFIKASI	45,100	4,532	,000
	KONVENTION	VITRIFIKASI	3,600	4,532	,434
KOND KROMATIN	AWAL	KONVENTION	6,850	3,505	,061
		VITRIFIKASI	3,510	3,505	,326
	KONVENTION	VITRIFIKASI	-3,340	3,505	,349

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	,936	5,499	8,000	50,000	,000
Wilks' lambda	,111	12,037 ^a	8,000	48,000	,000
Hotelling's trace	7,615	21,893	8,000	46,000	,000
Roy's largest root	7,559	47,245 ^b	4,000	25,000	,000

Each F tests the multivariate effect of GRUP. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MORFOLOGI	Contrast	1440,800	2	720,400	74,467	,000
	Error	261,200	27	9,674		
MOTILITAS	Contrast	10324,067	2	5162,033	50,205	,000
	Error	2776,100	27	102,819		
VIABILITAS	Contrast	12564,067	2	6282,033	61,175	,000
	Error	2772,600	27	102,689		
KOND KROMATIN	Contrast	234,661	2	117,330	1,910	,168
	Error	1658,778	27	61,436		

The F tests the effect of GRUP. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Lampiran 9 : Medium kriopreservasi dengan metode konvensional dan metode vitrifikasi / Krioprotektan

Glycerol

Nama lain : Glycerin

Rumus kimia : $C_3 H_8 O_3$

Berat Molekul : 92,9 g / mol

Berat jenis : 1,25 g / ml

Medium metode konvensional dan vitrifikasi :

Glyserol 15 % + HEPES + Human Serum Albumin 0,4% (Medium *freeze*, Fertipro, Belgi)

Ethylene Glycol (p.a. Merck®)

Nama lain : Ethandiol

Rumus kimia : $C_2 H_6 O_2$

Berat Molekul : 62,07 g / mol

Berat jenis : 1,11 g / ml

Medium Viotrifikasi :

PBS : Phospat Buffer Salin

40 % Etilen Glikol = 40 ml EG + 60 ml PBS

Sukrosa 0,3 M = $0,3 \times 342,3$ (BM Sukrosa)

= 102,69 g / 1 liter PBS

= 10,269 g / 100 ml PBS

$$\text{HSA } 6 \% = 6 \text{ g} / 100 \text{ ml PBS}$$

$$30 \% \text{ Etilen Glikol} = 30 \text{ ml EG} + 70 \text{ ml PBS}$$

$$20 \% \text{ Etilen Glikol} = 20 \text{ ml EG} + 80 \text{ ml PBS}$$

$$10 \% \text{ Etilen Glikol} = 10 \text{ ml EG} + 90 \text{ ml PBS}$$

$$\text{Sukrosa } 0,2 \text{ M} = 0,2 \times 342,3$$

$$= 68,46 \text{ g} / 1 \text{ liter PBS}$$

$$= 6,846 \text{ g} / 100 \text{ ml PBS}$$

$$\text{Sukrosa } 0,1 \text{ M} = 0,1 \times 342,3$$

$$= 34,23 \text{ g} / 1 \text{ liter PBS}$$

$$= 3,423 \text{ g} / 100 \text{ ml PBS}$$