

ABSTRACT

INTRODUCTION : Sperm cryopreservation, or sperm freezing, is widely used as method of long-term storage of different cell types and tissues including male and female gametes and embryos and applied in various assisted reproductive technique. Cryopreservation does not increase or maintain the quality of sperm. In fact, it decreases the quality of sperm during the freezing and thawing process. Cryopreservation agent (CPA) is used to protect sperm from damages caused by cryopreservation processes.

OBJECTIVE : This quasi-experimental study is aimed to evaluate the influence of cryopreservation agent (Test-yolk buffer) on motility and DNA fragmentation of normal sperms cryopreserved using "direct plunging" method.

METHODS: 40 normozoospermic samples are confirmed by routine semen analysis. And we assess the motility and DNA fragmentation before cryopreservation. Analysis of motility are done according to WHO's guidelines 1999 for sperm analysis. While analysis of DNA fragmentation is done using hyaluronic acid by SpermSlow®. Then the

samples are divided into 2 equal aliquots and drawn into separate cryostraw (0.25 ml). The first aliquot consists of 1:1 ratio of test-yolk buffer to semen while the second aliquot consists of semen only. After incubation to allow mixing, the samples are stored for a minimum of 24 hours by direct plunging in the liquid nitrogen tank at -196°C . Thawing is done by exposing the cryostraw to 37°C for 5 minutes and then reassess their post-thawed sperm motility and DNA Fragmentation.

RESULTS: Using independent t-test, the mean post-thawed sperm motility reduction for CPA-added samples is $29.93\% \pm 10.620$ and for non-CPA is $36.45\% \pm 11.320$. And the mean difference of pre-freeze and post-thaw sperm with minimal DNA fragmentation is $36.30\% \pm 7.796$ in CPA-added group and $44.65\% \pm 9.950$ in non-CPA group.

CONCLUSION : Reduction in motility for non-CPA group using direct plunging method is significantly higher and the difference of pre-freeze and post-thaw sperm with minimal DNA fragmentation is also higher in non-CPA group. These conclude that addition of CPA (test-yolk buffer) gives more advantages to post-thaw sperm in terms of maintaining the motility and preventing DNA

fragmentation in normal sperms by using "direct plunging" method.

KEYWORDS : Sperm cryopreservation, sperm motility, sperm DNA Fragmentation, Cryopreservation Agent, Test-yolk buffer, direct plunging method.

INTI SARI

LATAR BELAKANG : Simpan beku sperma telah digunakan untuk penyimpanan jangka panjang berbagai macam tipe sel dan jaringan termasuk gamet dan embrio baik laki-laki maupun perempuan dalam berbagai teknik bantuan reproduksi. Proses simpan beku tidak meningkatkan atau menjaga kualitas dari sperma. Pada kenyataannya, proses simpan beku akan menurunkan kualitas dari sperma selama proses pendinginan dan penghangatan kembali. Agen kriopreservasi digunakan untuk membantu melindungi sperma dari kerusakan yang disebabkan oleh proses simpan beku tersebut.

TUJUAN PENELITIAN : Studi quasi-eksperimental ini bertujuan untuk mengevaluasi peran dari agen kriopreservasi (Test-yolk buffer) pada motilitas dan fragmentasi DNA dari sperma yang normal yang dibekukan dengan metode "direct plunging (celup langsung)".

METODE : 40 sampel sperma normal yang dipastikan dengan analisis sperma rutin. Nilai motilitas dan fragmentasi DNA sebelum disimpan beku. Analisis dari motilitas dilakukan berdasarkan pedoman WHO tahun 1999 untuk analisa sperma. Sedangkan pemeriksaan fragmentasi

DNA dilakukan dengan menggunakan hyaluronic acid dari produk SpermSlow®. Setelah itu, sampel dibagi kedalam dua bagian yang sama dan dimasukkan ke dalam cryostraw (0.25 ml). Bagian pertama terdiri dari semen yang dicampurkan dengan test-yolk buffer dengan perbandingan 1:1, sedangkan bagian kedua terdiri dari semen saja. Lakukan inkubasi agar semen dan agen kriopreservasi bercampur. Lalu simpan sampel dengan metode celup langsung di dalam nitrogen cair bersuhu -196°C dengan minimum waktu penyimpanan selama 24 jam. Penghangatan kembali dilakukan dengan menaruh cryostraw pada suhu 37°C selama 5 menit dan lakukan penilaian kembali terhadap motilitas dan fragmentasi DNA.

HASIL : Dengan menggunakan independent t-test, rata-rata penurunan motilitas sperma setelah dibekukan adalah $29.93\% \pm 10.620$ untuk grup dengan tambahan agen kriopreservasi dan $36.45\% \pm 11.320$ untuk grup tanpa tambahan agen kriopreservasi. Sedangkan untuk rata-rata perbedaan sampel sperma dengan minimal fragmentasi DNA adalah $36.30\% \pm 7.796$ untuk grup dengan tambahan agen kriopreservasi dan $44.65\% \pm 9.950$ untuk grup tanpa tambahan agen kriopreservasi.

KESIMPULAN : Penurunan motilitas pada grup tanpa penambahan agen kriopreservasi adalah lebih tinggi secara signifikan. Dan rata-rata perbedaan sampel sperma dengan minimal fragmentasi DNA sebelum dan sesudah simpan beku juga lebih tinggi pada grup tanpa penambahan agen kriopreservasi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan test-yolk buffer sebagai agen kriopreservasi akan memberikan keuntungan yaitu menjaga motilitas sperma dan mencegah pembentukan fragmentasi DNA pada sampel sperma normal dengan metode pembekuan celup langsung.

KATA KUNCI : kriopreservasi sperma, motilitas sperma, DNA fragmentasi sperma, agen kriopreservasi, test-yolk buffer, metode celup langsung.