

Pengaruh *Escherichia coli* dan Lekosit terhadap kualitas spermatozoa manusia secara in vitro

(Influent of *E. Coli* and Leucocytes Againsts Human Sperm Quality in Vitro)

Sukarjati*, Duddy M Soebadi**, Aucky Hinting***, Sudjarwo****

ABSTRACT

Male genital tract infection has been recognized as one of the causes of infertility. Indicators of the occurrence of genital tract infection is the presence of bacteria during semen culture (bacteriospermia) and the finding of leucocyte of more than 1 million/ml semen (leucocytospermia). *E. coli* is the most common cause of prostatitis and epididymitis. The objective of this study was to explain the effect of *E. coli* and leucocyte on spermatozoa quality in vitro. This study comprised three experiments. In experiment 1 sperm was incubated with *E. coli*, in experiment 2 with lymphocyte, and experiment 3 with granulocyte. In those experiments, sperm motility and vitality. Spermatozoa were obtained from donor with normal spermatozoa according to WHO (1999). *E. coli* was obtained by culturing the semen of infertile males. Lymphocyte and granulocyte were obtained from donors' blood. Sperm preparation was made using Percoll gradient column method. Lymphocyte isolation was performed using Histopaque 1077, and granulocyte isolation used Histopaque 1077 and 1119. Sperm motility and vitality was observed by means of conventional method with microscope. The result of this study showed that in vitro *E. coli* had effect on the motility ($p = 0.000$) and vitality ($p = 0.000$) of sperm. Lymphocyte had effect on the motility ($p = 0.034$) and vitality ($p = 0.041$). Granulocyte had effect on motility ($p = 0.000$) and vitality ($p = 0.017$). In conclusion, *E. coli* has effect on the reduction of sperm quality through *E. coli* adhesion to the sperm. In leukocyte, granulocyte has higher effect in the reduction of sperm quality. Sperm quality reduction by granulocyte undergoes through the mechanism of ROS production.

Key words: sperm quality, *E. coli*, lymphocyte, granulocyte

PENDAHULUAN

Infertilitas merupakan masalah dalam suatu perkawinan dimana sebagian masyarakat beranggapan wanita sebagai penyebab tidak bisa memberi keturunan. Menurut **Sikka et al.** (2001), 30-50% kasus infertilitas disebabkan oleh pihak pria. Penyebab infertilitas pria telah diidentifikasi yaitu mutasi gen, aneuploid, varikokel, radiasi, kemoterapi, gangguan ereksi, oklusi duktus ejakulatorius dan infeksi (**Ollero et al.**, 2001). Menurut **Khanna et al.** (1992), infeksi traktus genitalis pria merupakan penyebab infertilitas sebesar 10%. Infeksi traktus genitalis dan kelenjar seks aksesori pria (MAGI/Male Accessory Gland Infection) meliputi prostatitis, epididimitis, vesikulitis dan orchitis merupakan suatu masalah karena bersifat asimtomatis dan merupakan faktor penyebab penting pada infertilitas

pria (**Sikka et al.**, 2001). Hasil penelitian **Hinting** (2006) diperoleh bahwa dari 1032 pria infertil, insiden infeksi kelenjar seks aksesori pria sebesar 13,4%. Prevalensi infeksi kelenjar seks aksesori pada pasien dengan *Mixed Antiglobulin Reaction* (MAR) positif sekitar 20% (**Hinting et al.**, 1996).

Infeksi traktus genitalis dapat menyebabkan infertil, karena mikroorganisme yang menginfeksi traktus genitalis dapat memengaruhi fertilitas baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung yaitu dengan perlekatan bakteri ke spermatozoa atau toksin yang dihasilkan oleh bakteri (**Wolff et al.**, 1993). Secara tidak langsung bahwa infeksi dapat menyebabkan obstruksi atau lesi nondestruktif pada duktus ekskretori dan lesi pada kelenjar seks aksesori (**Auroux et al.**, 1991). Infeksi traktus genitalis juga dapat

* Biologi, FMIPA Universitas PGRI Adi Buana Surabaya

** Departemen Urologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

*** Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

**** Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

merusak *blood testis barrier* yang mengakibatkan kebocoran lekosit dalam tubulus seminiferus atau epididimis (**Alvarez et al.**, 2002).

Indikator bahwa telah terjadi infeksi traktus genitalis adalah adanya bakteri saat dilakukan kultur semen (bakteriospermia) dan ditemukannya lekosit dengan jumlah lebih dari 1 juta/ml semen (lekositospermia) (**Fraczek et al.**, 2004). Konsentrasi bakteri $\geq 10^3$ colony forming unit (cfu)/ml patogen traktus urinarius di dalam ejakulat ditetapkan sebagai bakteriospermia (**Weidner et al.**, 1999).

Hasil studi yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara spesies bakteri dan jumlah lekosit terhadap kualitas spermatozoa. *Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan penyebab utama prostatitis dan epididimitis (**Liu et al.**, 2002). *E. coli* dapat menurunkan motilitas spermatozoa secara in vitro (**Diemer et al.**, 1996; **Huwe et al.**, 1998) dan dapat menyebabkan aglutinasi spermatozoa (**Wolff et al.**, 1993). Fusi spermatozoa dengan oosit hamster berkurang setelah inkubasi spermatozoa dengan *E. coli*. Disamping itu *E. coli* juga menunjukkan menutup segmen equatorial membran spermatozoa manusia. Menurut **Cummins** (1995), segmen equator membran spermatozoa berfungsi sebagai tempat fusi spermatozoa dengan oosit. Dengan demikian tertutupnya segmen equator dapat menurunkan tingkat fertilisasi.

Salah satu faktor dari *E. coli* yang dapat menurunkan kualitas spermatozoa karena kemampuan *E. coli* melekat ke membran spermatozoa (**Monga and Robert**, 1994). Menurut **Auroux et al.** (1991), *E. coli* berpengaruh terhadap spermatozoa hanya ketika *E. coli* tersebut mengadakan kontak dengan spermatozoa. Menurut **Diemer et al.** (1996), interaksi *E. coli* dan spermatozoa terjadi 2 tahap yaitu adhesi lalu destruksi membran spermatozoa.

Dengan menggunakan transmisi elektron mikroskop, **Wolff et al.** (1993), menunjukkan bahwa *E. coli* melekat pada kepala dan ekor spermatozoa. Reseptor *E. coli* pada spermatozoa ada pada kepala dan ekor spermatozoa dan merupakan bagian dari protein membran spermatozoa.

Lekosit ada di testis pada saat terjadi sirkulasi monosit mencapai gonad selama kehidupan fetus. Bertambahnya konsentrasi lekosit dalam semen merupakan indikator infeksi traktus genitalis (**Alvarez et al.**, 2002). Insiden lekositospermia berkisar 10–20% pada pria infertil, dan *Polymorphonuclear neutrophil* (PMN) serta makrofag adalah komponen utama lekosit seminal plasma (**Agarwal et al.**, 2002). Lekosit yang mengkontaminasi semen dapat secara potensial merusak spermatozoa melalui substansi

toksik seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berkaitan dengan fagositosis.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji lebih lanjut pengaruh *E. coli*, limfosit dan granulosit terhadap motilitas dan vitalitas spermatozoa manusia secara in vitro.

MATERI DAN METODE

Spermatozoa diperoleh dari donor yang mempunyai spermatozoa normal menurut kriteria **WHO** (1999). *E. coli* diperoleh dengan mengkultur semen pria infertil. Limfosit dan granulosit di peroleh dari donor.

Besar sampel yang digunakan adalah: pada inkubasi spermatozoa dengan *E. coli*: pengamatan motilitas dan vitalitas spermatozoa digunakan 9 sampel. Pada inkubasi spermatozoa dengan limfosit: pengamatan motilitas dan vitalitas sperma digunakan 12 sampel, Inkubasi spermatozoa dengan granulosit: pengamatan motilitas dan vitalitas digunakan 16 sampel.

Penelitian ini terdiri atas 3 eksperimen yaitu:

Eksperimen 1 bertujuan untuk menjelaskan pengaruh inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* secara in vitro terhadap kualitas spermatozoa; Eksperimen 2 bertujuan untuk menjelaskan pengaruh inkubasi spermatozoa dengan limfosit secara in vitro terhadap kualitas spermatozoa; Eksperimen 3 bertujuan untuk menjelaskan pengaruh inkubasi spermatozoa dengan granulosit secara in vitro terhadap kualitas spermatozoa.

Preparasi *E. coli*

Satu tetes semen (1/20 ml) diratakan dengan cara goresan metode standar bakteriologi pada agar darah, kemudian di inkubasi pada 37°C selama 24 jam. Setelah ada pertumbuhan koloni bakteri biakan dipindah pada medium Mac Conkey dan EMB dan di inkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram. Kemudian dilakukan uji fisiologi atau biokimia. *E. coli* memiliki sifat-sifat: Indol (+), MR (+), VP (–), Sitrat (–), H₂S (–), Urea (–), Lisin (+), Motilitas (+), Produk asam dan gas: pada glukosa (+), Laktosa (+) Maltosa (+) Mannosa (+) (**Buchanan and Gibbon**, 1994).

E. coli ditanam pada Mc Conkey 24 jam, 37°C, selanjutnya dibiakkan pada medium cair BHI pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan dalam BHI disentrifus 6.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Pellet disuspensikan dengan PBS, disentrifus lagi 6.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet ditambah PBS 10 ml, dan dilakukan pengenceran serial. Selanjutnya kandungan bakteri dibuat 10⁸/ml (Konsentrasi sel OD = 1,0 λ = 600 nm adalah 8 × 10⁸/ml).

Preparasi spermatozoa

Spermatozoa berasal dari ejakulat pria yang mempunyai spermatozoa normal menurut kriteria **WHO** (1999). Semen diperoleh dengan cara masturbasi dan ditampung ke dalam botol kaca atau plastik steril yang bermulut lebar setelah abstinencia sedikitnya 2 hari dan tidak lebih lama dari 7 hari. Setelah liquifaksi dilakukan analisa spermatozoa menurut kriteria **WHO** (1999). Kriteria spermatozoa normal menurut **WHO** (1999) adalah: Volume: 2 ml atau lebih, pH: 7,2–7,8, Konsentrasi sperma: 20 juta spermatozoa/ml atau lebih. Total jumlah sperma: 40 juta sperma / ejakulat atau lebih, Motilitas: 50% atau lebih kategori a+b atau 25% atau lebih kategori a, Morfologi: 15% atau lebih mempunyai morfologi normal, Vitalitas: 75% atau lebih hidup. Sel darah putih: kurang dari 1 juta/ml. Selanjutnya dilakukan preparasi spermatozoa menggunakan metode kolom bertingkat Percoll (Sil Select Plus).

Spermatozoa hasil Percoll dibagi 2 bagian (A dan B). Masing-masing bagian diberi perlakuan sebagai berikut:

- A. Spermatozoa diinokulasi dengan *E. coli*
- B. Spermatozoa sebagai kontrol.

Inkubasi spermatozoa-bakteri dilakukan dalam *microtube* eppendorf 1,5 ml dengan ratio sperma/*E. coli* = 1:1. Inkubasi dilakukan selama 3 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap kualitas spermatozoa meliputi motilitas dan vitalitas spermatozoa.

Pengamatan motilitas

Spermatozoa hasil inkubasi dengan *E. coli* diambil satu tetes pada *object glass* lalu ditutup *cover glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Motilitas ditentukan dengan kategori menurut **WHO** (1999) yaitu a. gerakan cepat maju lurus ke depan. b. gerakan lambat ke depan c. tidak bergerak maju atau bergerak di tempat d. tidak bergerak. Dilakukan penghitungan pada 100 spermatozoa.

Spermatozoa hasil inkubasi dengan *E. coli* diambil satu tetes pada *object glass*, ditetesi satu tetes Eosin Y dan dicampur. Pengamatan dilakukan setelah 30 detik di bawah mikroskop dengan pembesaran 400×. Spermatozoa hidup tidak tercat dan sperma mati tercat merah. Dihitung pada 100 spermatozoa.

Eksperimen 2: Pengaruh inkubasi spermatozoa dengan limfosit secara in vitro terhadap kualitas spermatozoa

Prosedur koleksi semen, persyaratan semen yang digunakan sebagai sampel dan preparasi spermatozoa sama seperti pada eksperimen 1.

Limfosit disiapkan menggunakan Histopaque 1077 (*Sigma Aldrich*). 10 ml darah dimasukkan tabung steril

disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar kemudian diaduk dan disentrifus lagi pada 1500 rpm selama 5 menit, kemudian serum dibuang. Tabung sentrifus steril diisi dengan 3 ml histopaq. Kemudian 3 ml darah dialirkan melalui dinding tabung yang telah berisi histopaq dan disentrifus 2200 rpm selama 30 menit. Selanjutnya plasma dibuang dan lapisan putih (sel mononuklear) di pipet dengan hati hati dipindah ke tabung sentrifus steril lain, selanjutnya ditambah PBS 10 ml diaduk dan disentrifus 1200 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan pellet ditambah PBS 5 ml kemudian disentrifuge lagi 1200 rpm selama 10 menit. Kemudian pellet ditambah 0,5 ml PBS dan dihitung konsentrasi limfosit menggunakan Haemositometer Neuber serta diamati viabilitasnya menggunakan *tripan blue*.

Spermatozoa hasil Percoll dan limfosit yang telah dipreparasi selanjutnya diperlakukan sebagai berikut.

- A. Spermatozoa hasil Percoll tanpa limfosit.
- B. Spermatozoa hasil Percoll diinkubasi dengan limfosit.

Inkubasi dilakukan selama 3 jam pada *microtube* eppendorf 1,5 ml. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap motilitas, vitalitas. Prosedur pengamatan motilitas, vitalitas spermatozoa, sama seperti yang dilakukan pada eksperimen 1. Prosedur koleksi semen, persyaratan semen yang digunakan sebagai sampel dan preparasi spermatozoa sama seperti pada eksperimen 1.

Granulosit disiapkan menggunakan Histopaque 1077 dan 1119 (*Sigma Aldrich*). 10 ml darah dimasukkan tabung steril disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar kemudian diaduk dan disentrifus lagi pada 1500 rpm selama 5 menit kemudian serum dibuang. Tabung sentrifus steril dengan hati hati diisi dengan histopaque 1119 sebanyak 3 ml. Kemudian dengan hati-hati ditambahkan histopaque 1077 sebanyak 3 ml. 6 ml darah yang sudah dibuang serumnya ditambahkan dengan cara mengalirkan melalui dinding tabung. Kemudian disentrifus pada 700 × g selama 30 menit. Hasilnya akan tampak lapisan-lapisan pada tabung sentrifus yaitu mulai dari atas kebawah sebagai berikut: lapisan plasma, lapisan *mononuclear cell*, lapisan histopaque 1077, lapisan granulosit, lapisan histopaque 1119 dan yang terbawah lapisan erithrosit. 3 lapisan teratas dibuang, dan dengan hati-hati lapisan granulosit di pipet dan ditampung pada tabung lain. Pada tabung yang berisi granulosit ditambahkan 10 ml PBS steril dan disentrifus pada 200 × g selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet ditambah 10 ml PBS steril dan disentrifus 200 × g selama 10 menit. Proses pencucian ini diulang sekali lagi. Selanjutnya 0,5 ml pellet yang berisi granulosit ini diresuspensi dengan

0,5 ml medium Earle's. Kemudian dihitung konsentrasi sel menggunakan Haemocytometer Neuber, dan diamati viabilitas selnya.

Spermatozoa hasil Percoll dan granulosit yang telah diisolasi selanjutnya diperlakukan sebagai berikut:

- A. Spermatozoa tanpa granulosit.
- B. Spermatozoa di inkubasi dengan granulosit.

Inkubasi dilakukan di *microtube eppendorf* selama 3 jam. Selanjutnya diamati motilitas dan vitalitas spermatozoa.

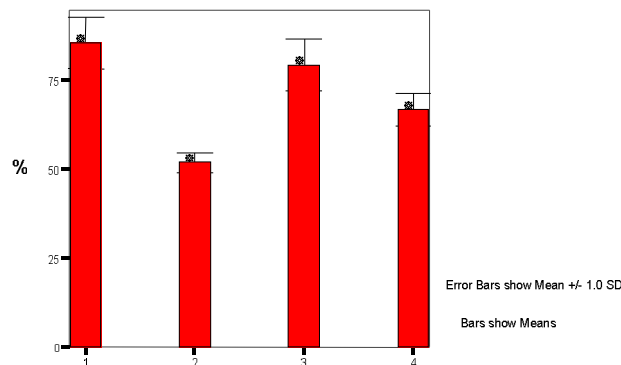
Prosedur pengamatan motilitas dan vitalitas spermatozoa sama seperti yang dilakukan pada eksperimen 1. Pengaruh inkubasi spermatozoa dengan *E. coli*, spermatozoa dengan limfosit, spermatozoa dengan granulosit terhadap motilitas dan vitalitas spermatozoa data di uji dengan t-test. Penghitungan statistik menggunakan program SPSS, V. 11.5.

HASIL DAN DISKUSI

Pengaruh inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* terhadap kualitas spermatozoa

Dilakukan analisis pengaruh inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* terhadap motilitas kategori a + b dan vitalitas. Data motilitas kategori a + b dan vitalitas pada spermatozoa dan spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli* disajikan dalam grafik 1.

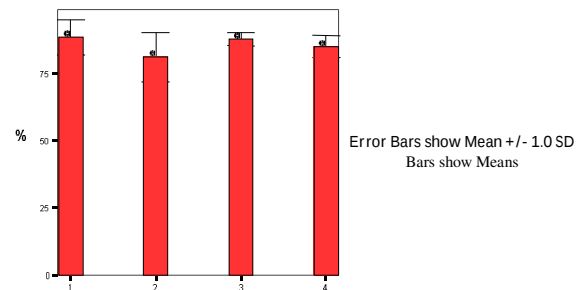
Hasil analisis data di dapat bahwa antara spermatozoa dan spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli* terjadi perbedaan motilitas spermatozoa kategori a + b ($p = 0,00$) dan vitalitas ($p = 0,000$).



Grafik 1. Pengaruh *E. coli* terhadap motilitas dan vitalitas spermatozoa setelah 3 jam inkubasi. Keterangan: 1) Mot. sperma; 2) Mot. sperma + *E. coli*; 3) Vit sperma; 4) Vit. sperma + *E. coli*; $t_{mol} = 13.161$, $p = 0.000$; $t_{vit} = 4.375$, $p = 0.000$.

Pengaruh inkubasi spermatozoa dengan limfosit terhadap kualitas spermatozoa

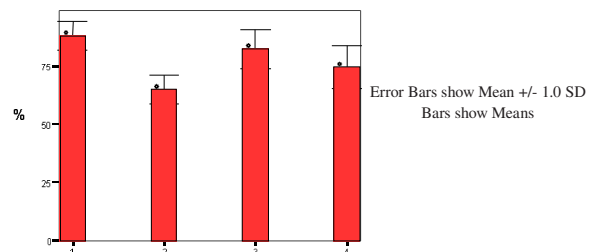
Hasil analisis data di dapat bahwa terjadi perbedaan motilitas spermatozoa kategori a + b ($t = 2,262$, $p = 0,034$) dan vitalitas ($t = 2,174$, $p = 0,041$) antara spermatozoa dengan spermatozoa yang diinkubasi dengan limfosit selama 3 jam secara in vitro. Data motilitas kategori a + b dan vitalitas pada spermatozoa dan spermatozoa yang diinkubasi dengan limfosit disajikan dalam grafik 2 sebagai berikut:



Grafik 2. Pengaruh inkubasi sperma dengan limfosit selama 3 jam terhadap kualitas sperma. Keterangan: 1) Mot sperma; 2) Mot sperma + limfosit; 3) Vit sperma; 4) Vit sperma + limfosit; $t_{mot} = 2,262$, $p = 0.034$; $t_{vit} = 2.174$, $p = 0.041$

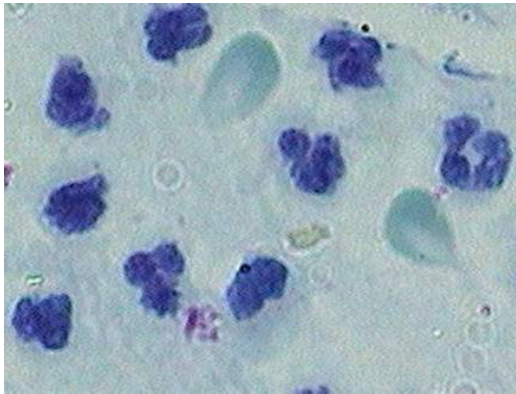
Pengaruh inkubasi spermatozoa dengan granulosit terhadap kualitas spermatozoa

Hasil analisis data didapat bahwa ada perbedaan motilitas spermatozoa kategori a + b ($t = 10,655$, $p = 0,000$) dan vitalitas ($t = 2,516$, $p = 0,017$) antara spermatozoa dengan spermatozoa yang diinkubasi dengan granulosit. Data motilitas kategori a + b dan vitalitas pada spermatozoa dan spermatozoa yang diinkubasi dengan granulosit disajikan dalam grafik 3 sebagai berikut:



Grafik 3. Pengaruh Inkubasi sperma dengan granulositselama 3 jam terhadap kualitas sperma. Keterangan: 1) Mot sperma; 2) Mot sperma + granulosit; 3) Vit sperma; 4) vit sperma + granulosit.

Hasil isolasi granulosit adalah sebagai berikut.



Gambar 1. Granulosit.

Inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* berpengaruh terhadap motilitas kategori a + b dan vitalitas. Pergerakan (motilitas) spermatozoa disebabkan adanya geseran mikrotubul dari letaknya dan geseran ini membutuhkan energi sehingga menggerakkan ekor dan mendorong kepala spermatozoa (**Amelar et al.**, 1980). Vitalitas spermatozoa menggambarkan proporsi spermatozoa hidup yang tidak terpulas oleh reagen pewarna. Pemulasan sperma hidup berdasarkan prinsip bahwa sel mati dengan membran plasma yang rusak akan dimasuki oleh zat warna (**WHO**, 1999). Pada grafik 1, tampak bahwa terjadi penurunan motilitas kategori a+b maupun vitalitas yang lebih besar pada spermatozoa yang diinkubasi dengan *E. coli* daripada spermatozoa kontrol.

Faktor dari *E. coli* yang dapat menurunkan kualitas spermatozoa karena kemampuan *E. coli* melekat ke membran spermatozoa (**Monga dan Robert**, 1994). Menurut **Auroux et al.** (1991), *E. coli* berpengaruh terhadap spermatozoa hanya ketika *E. coli* tersebut mengadakan kontak dengan spermatozoa. Menurut **Diemer et al.** (1996), interaksi *E. coli* dan spermatozoa terjadi 2 tahap yaitu adhesi kemudian destruksi membran spermatozoa. Dengan menggunakan transmisi elektron mikroskop, **Wolff et al.** (1993) menunjukkan bahwa *E. coli* melekat pada kepala dan ekor spermatozoa. Reseptor *E. coli* pada spermatozoa ada pada kepala dan ekor spermatozoa dan merupakan bagian dari protein membran spermatozoa. Adanya perlekatan *E. coli* ke spermatozoa dapat menyebabkan perubahan integritas struktur membran spermatozoa. Menurut **Hafez** (1976) secara umum membran spermatozoa mempunyai fungsi sebagai media transport semua zat yang dibutuhkan spermatozoa. Menurut **Zaneveld** (1985)

membran spermatozoa khususnya bagian ekor mempunyai fungsi untuk mendapatkan substrat yang dibutuhkan sebagai sumber energi dan berfungsi untuk menghantarkan gelombang gerakan. Dengan adanya perlekatan *E. coli* pada membran spermatozoa menyebabkan kerusakan membran. Kerusakan membran menyebabkan vitalitas spermatozoa menurun. Kerusakan membran spermatozoa juga akan menimbulkan gangguan transport zat yang dibutuhkan sebagai sumber energi. Energi tersebut dibutuhkan dalam pergerakan spermatozoa, sehingga adanya gangguan sumber energi akan menyebabkan pergerakan spermatozoa terganggu.

Hasil studi **Diemer et al.** (2000) membuktikan bahwa immobilisasi spermatozoa oleh *E. coli* disebabkan oleh kerusakan membran plasma dan struktur selluler yang lain pada spermatozoa. Dinyatakan pula bahwa perubahan proses biokimia pada integritas membran tampaknya lebih mungkin sebagai penyebab perubahan morfologi dibanding pengaruh fisik yang dihasilkan dari adhesi bakteri. Agen toksik yang dihasilkan *E. coli* seperti hemolisin mungkin menyebabkan pengaruh lokal setelah adanya adhesi bakteri ke permukaan spermatozoa. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan hal ini.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian **Diemer et al.**, (1996) dan **Huwe et al.** (1998) yang melaporkan bahwa inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* secara in vitro menurunkan motilitas spermatozoa. *Ureaplasma urealiticum*, *Chlamydia trachomatis* dan *E. coli* dapat melekat ke spermatozoa. Perlekatan yang cukup kuat untuk menginduksi heteroaglutinasi dari mikroorganisme dengan spermatozoa motil hanya ditunjukkan oleh *E. coli* (**Bartoov**, 1991).

Pada penelitian ini juga terdeteksi adanya aglutinasi spermatozoa. Terjadi perlekatan antara kepala dengan kepala, kepala dengan ekor atau kombinasinya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian **Wolff et al.**, (1993) yang melaporkan adanya aglutinasi pada inkubasi spermatozoa dengan *E. coli*.

Pada penelitian ini inkubasi spermatozoa dengan *E. coli* dilakukan pada *microtube eppendorf* 1,5 ml dengan perbandingan 1:1 selama 3 jam inkubasi. Keadaan ini sudah mampu menurunkan motilitas spermatozoa. Hasil penelitian **Diemer et al.**, (1996) dinyatakan bahwa pengaruh *E. coli* terhadap motilitas spermatozoa tergantung pada konsentrasi bakteri. Dari hasil penelitiannya didapat bahwa motilitas spermatozoa dihambat pada ratio spermatozoa/*E. coli* sekitar 1 yang dicapai oleh pertumbuhan *E. coli* sekitar 3-5 jam inkubasi dan tergantung awal konsentrasi. Pengaruh jumlah *E. coli* terhadap motilitas spermatozoa telah banyak diteliti.

Konsentrasi 10^6 mikroorganisme /ml dapat menurunkan motilitas sekitar 40%, dan *clumping* terjadi pada konsentrasi 10^6 dan 10^7 . **Comhaire et al.**, (1980) memberikan batasan bahwa bakteri patogen berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa bila berjumlah $\geq 10^3$ mikroorganisme/ ml, sedang non patogen $\geq 10^4$ mikroorganisme/ml.

Pengaruh Limfosit terhadap kualitas spermatozoa

Pada grafik 2, tampak bahwa terjadi penurunan motilitas kategori a + b maupun vitalitas yang lebih besar pada spermatozoa yang diinkubasi dengan limfosit dari pada spermatozoa kontrol. Limfosit merupakan komponen seluler pada respon imun. Dari hasil penelitian ini tampak bahwa interaksi antara limfosit dengan spermatozoa tidak terlalu kuat untuk menurunkan kualitas spermatozoa secara in vitro.

Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa inkubasi spermatozoa dengan granulosit secara signifikan menurunkan motilitas kategori a + b dan vitalitas spermatozoa. Granulosit dapat mengeluarkan ROS (**Wolff**, 1995) dan sitokin (**Ochsendorf**, 1999). Tingginya kadar ROS menurut **Puruhit et al.**, (1999) menyebabkan patologi pada spermatozoa seperti menurunnya ATP dan spermatozoa menjadi kehilangan motilitasnya. Inkubasi spermatozoa dengan ROS pada satu jam pertama telah menurunkan motilitas spermatozoa secara signifikan (**de Lamirande** dan **Gagnon**, 1992 b; **Baumber et al.**, 2000). **Ruiz-Pesini et al.**, (1998) menyatakan motilitas spermatozoa tergantung pada energi yang dihasilkan oleh mitokondria. Dilaporkan bahwa gangguan motilitas berhubungan dengan delesi mtDNA yang mengkode kompleks I, III dan IV serta delesi pada nDNA yang mengkode kompleks II.

Ochsendorf et al. (1999), melaporkan motilitas sperma menurun pada spermatozoa hasil Percoll yang ditambah granulosit yang diaktivasi setelah 1 jam. Setelah ditambahkan seminal plasma, terjadi penurunan khemiluminisensi dan mencegah hilangnya motilitas. **Ochsendorf et al.** (1999), juga menunjukkan bahwa konsentrasi lekosit dalam *whole semen* antara $1,4 \cdot 10^4$ dan $2,97 \cdot 10^4$ tidak berpengaruh terhadap fungsi sperma.

Ada beberapa mekanisme yang menjelaskan hubungan penurunan motilitas spermatozoa dengan ROS. Peroksidasi asam lemak tak jenuh pada lipid membran merupakan satu mekanisme yang sering disebut (**Aitken et al.**, 1993, **Baumber et al.**, 2000). Pada membran spermatozoa mudah terjadi peroksidasi lipid karena kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi pada membran plasmanya. Akibat dari peroksidasi lipid adalah hilangnya asam lemak tak jenuh yang berhubungan dengan produksi radikal lipid

hidroperoksida, radikal alkoksil dan radikal peroksil. Radikal ini mendukung reaksi berantai lipid peroksidasi dan menyebabkan produksi aldehyd sitotoksik seperti malondialdehyd. Tingginya konsentrasi asam lemak tak jenuh diperlukan untuk memberikan fluiditas membran plasma yang diperlukan untuk motilitas. Hilangnya integritas dapat menyebabkan bertambahnya permeabilitas membran dan hilangnya kemampuan untuk mengatur konsentrasi ion intraseluler yang terlibat dalam mengontrol pergerakan spermatozoa.

ROS berpengaruh terhadap motilitas dapat juga melalui mekanisme berubahnya fungsi mitokondria. Potensial membran mitokondria digunakan sebagai ukuran fungsi mitokondria meliputi sintesis ATP, import protein mitokondria, homeostasis calcium dan transport metabolit (**Baumber et al.**, 2000). **Sanocka** dan **Kurpisz** (2004) juga menyatakan bahwa tingginya kadar ROS berhubungan dengan penurunan potensial membran mitokondria.

Kaitan tingginya ROS dengan menurunnya motilitas spermatozoa juga dapat dijelaskan pada menurunnya fosforilasi protein axonema yang diperlukan untuk pergerakan sperma. ROS menghambat satu atau lebih enzim pada fosforilasi oksidatif, glikolisis atau keduanya yang membatasi dihasilkannya ATP oleh sperma (**Baumber et al.**, 2000). Penjelasan yang lain adalah bahwa H_2O_2 dapat berdifusi melintasi membran menghambat aktivitas enzim G6PD. Enzim ini mengontrol kecepatan aliran glukosa melalui *hexosa monophosphate shunt* yang selanjutnya mengontrol tersedianya NADPH intraseluler yang digunakan sebagai sumber elektron oleh spermatozoa untuk pembakaran yang menghasilkan ROS oleh sistem enzim NADPH oksidase. Penghambatan G6PD juga mengakibatkan menurunnya NADPH dan secara bersamaan terjadi akumulasi glutathion teroksidasi menjadi glutathion tereduksi. Hal ini dapat mengurangi antioksidan (**Agarwal et al.**, 2003).

Sitokin yang dihasilkan lekosit menambah dihasilkannya ROS oleh spermatozoa (**Rajasekaran et al.**, 1995; **Ochsendorf**, 1999). IFN-gamma mempertinggi TNF-alpha pada *respiratory burst* PMN (**Ochsendorf**, 1999). Pada studi in vitro, sitokin seperti IFN-gamma dan TNF-alpha dapat menurunkan motilitas spermatozoa (**Hill et al.**, 1987).

DAFTAR PUSTAKA

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA, 2003. Role of Reactive Oxygen Species in The pathophysiology of Human Reproduction, Fertil Steril, 79: 829–843.

- Agarwal A, Thomas AJ**, 2002. Leucocytospermia and male infertility. What is New? <http://www.TheReproResearch.html>.
- Aitken RJ**, 1993. Analysis of Lipid Peroxidation Mechanism in Human Spermatozoa, *Molecular Reproduction and Development*, 35: 302–315.
- Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Evenson DP, Argawal A**, 2002. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay, *Fertil Steril*, 78: 319–329.
- Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld CY**, 1980. Sperm Motility, *Fertil Steril*, 34(3): 197–215.
- Auroux MR, Jacquest L, Mathieu D, Aurer J**, 1991. Is The Sperm Bacterial ratio a Determining Factor in Impairment of Sperm Motility; An In Vitro Study in Man With *E. coli*, *Int. J of Andrology*, 14: 264–270.
- Bartoov BD, Ozbontil MC, Maayan E, Ohad and Y Nitzan**, 1991. Virulence Characteristic of Male Genital tract *E. coli* Isolated from semen of Suspected Infertile men, *Andrologia*, 23: 387–394.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG**, 2000. The effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane potential, and membrane lipid Peroxidation, *J Androl*, 21: 895–902.
- Comhaire F, Verschraegen G, and Vermeulen L**, 1980. Diagnosis of Accessory Gland infection its possible role in male infertility, *Int. J of Andrology*, 3: 32–45.
- de Lamirande E, and Gagnon C**, 1992. b, Reactive oxygen species (ROS) and human spermatozoa, II: Depletion of adenosine triphosphate, *J Androl*, 13: 379–386.
- Diemer T, Weidner W, Michelmann HW, Schiver HG, Rovin E, and Mayer F**, 1996. Influence of *E. coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro, *Int. J of Andrology*, 19: 271–277.
- Diemer T, Huwe P, Michelmann HW, Mayer F, Schifer HG, Weidner W**, 2000. *E. coli*-induced Alterations of Human Spermatozoa. An Electron microscopy analysis, *Int. J of Andrology*, 23: 0178–186.
- Fraczek M, Sanocka D, and Kurpisz M**, 2004. Interaction between Leucocytes and Human Spermatozoa Influencing Reactive Oxygen Intermediates Release, *Int. J of Andrology*, 27: 69–75.
- Hafez ESE, Prasad MRN**, 1976. Functional aspect of the epididymis, in: *Human semen and Fertility regulation in men*, First ed., St Louis, Hafez ESE., (Ed) The CV. Mosby Company, 31–42.
- Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ**, 1987. Effect of soluble Products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and Monokines) on human sperm motion parameter, *Fertil Steril*, 47: 460–465.
- Hinting A**, 2006. Standardized management of male infertility, Post Graduate course of Andrology I: Comprehensive Management of male infertility, Surabaya, 6-8 April 2006.
- Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Liu J, Schiefer HG, Weidner W**, 1998. Influence of different urophatogenic microorganism on human sperm motility parameters in an in vitro experiment, *Andrologia*, 30(1): 55–59.
- Khanna J, Van Look PFA, Griffin PD**, 1992. A Key to brighter future, Geneva, World Health Organization.
- Liu Jh, Li HY, Cao SG, Duan YF, Li Y**, 2002. Influence of Several Urophatogenic Microorganism on Human Sperm Motility in Vitro, *Asian J Androl*, 4: 179–182.
- Monga M, Robert JA**, 1994. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-specific Interaction, *J of Andrology*, 15: 151–156.
- Ochsendorf FR**, 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species, *Human Reproduction Update*, 5(5): 399–420.
- Ollero M, Guzman EG, Lopez MC, Sharma RK, Argawal A, Larson K, Evenson D, Thomas Jr AJ, Alvarez JG**, 2001. Characterization of subset of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility, *Human Reproduction*, 16(9): 1912–1921.
- Purohit SB, Laloraya M, Kumar GP**, 1999. Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa, *Asian J Androl*, 1: 95–107.
- Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Naz RK, and Sikka SC**, 1995. Oxidative Stress and Interleukins in Seminal Plasma During Leucocytospermia, *Fertil Steril*, 64: 166–171.
- Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, and Lopez Perez MJ**, 1998. Correlation of sperm motility

- with mitochondrial enzymatic activities, *Clinical Chemistry*, 44(8): 1616–1620.
- Sanocka D**, and **Kurpisz M**, 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells, *Reprod Biol Endocrinol*: 2(1): 1–13.
- Sikka SC**, **Champion HC**, **Bivalacqua TJ**, **Estrada LS**, **Wang R**, **Rajasekaran M**, **Agarwal BT**, and **Hellstrom WJG**, 2001. Role of genitourinary inflammation in infertility: synergistic effect of lipopolysaccharide and interferon γ on human spermatozoa, *Int. J of Andrology*, 24: 136–141.
- Weidner W**, **Krause W**, and **Ludwig M**, 1999. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis, *Human Reproduction Update*, 5(5): 421–432.
- Wolff H**, **Panhans A**, **Stolz W**, **Mauree M**, 1993. Adherence of *E. coli* to Sperm: A Mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*, *Fertil Steril*, 60: 154–158.
- Wolff H**, 1995. The Biologic significance of white blood cells in semen, *Fertil Steril*, 63: 1143–1157.
- World Health Organization**, 1999. WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Zaneveld LJD**, 1985. The Biology of Spermatozoa, Presented In: Konggres Nasional III PANDI, Jakarta: 15–39.