

KRIOPRESERVASI SPERMA MANUSIA: SYSTEMATIC REVIEW

Diana Fadhilah¹, Adam Raihan Priambada², Zozy Aneloi Noli³, Rita Maliza⁴
Universitas Andalas^{1,2,3,4}
ritamaliza@sci.unand.ac.id⁴

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis metode dan efek kriopreservasi sperma manusia. Penulisan tinjauan ini dilakukan melalui metode review literatur dari database internasional seperti Scopus dan PubMed. Hasil penelitian menunjukkan, dengan adanya pemilihan metode kriopreservasi, pemilihan agen krioprotektan seperti TAT-PRDX2, canthaxanthin, atau ekstrak coleomic *Holothuria parva*, dapat meningkatkan motilitas, viabilitas, dan integritas sperma setelah kriopreservasi, krioprotektan agen yang tepat bisa mempertahankan sel dari stress oksidatif dan fragmentasi DNA.

Kata Kunci: Kriopreservasi, Manusia, Sperma

ABSTRACT

This study aims to identify the types of methods and effects of human sperm cryopreservation. This review was written using a literature review method from international databases such as Scopus and PubMed. The results of the research show that by choosing a cryopreservation method, choosing a cryoprotectant agent such as TAT-PRDX2, canthaxanthin, or Holothuria parva coleomic extract, can increase sperm motility, viability and integrity after cryopreservation, the right cryoprotectant agent can defend cells from oxidative stress and fragmentation DNA.

Keywords: Cryopreservation, Human, Sperm

PENDAHULUAN

Kriopreservasi merupakan suatu proses dimana sel, seluruh jaringan atau zat lain yang rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh reaktivitas kimiawi atau waktu, diawetkan dengan cara mendinginkannya hingga suhu di bawah 0°C. Kriopreservasi semen yaitu proses pengawetan sel sperma. Saat ini, kriopreservasi sperma merupakan cara yang paling banyak digunakan untuk mempertahankan fungsi reproduksi pada pria yang menjalani pengobatan yang bersifat gonadotoksik seperti kemoterapi atau radioterapi (Oberoi et al., 2014). Selain itu, kriopreservasi sperma juga banyak digunakan pada kasus-kasus kelainan lain seperti penyakit autoimun, sindrom mielodisplasia yang membutuhkan pengobatan yang dapat mempengaruhi fungsi reproduksi. Pasien dengan oligospermia berat atau gangguan ejakulasi juga ditawarkan untuk kriopreservasi sperma dengan melakukan injeksi sperma intracytoplasmic (ICSI). Kriopreservasi sperma juga dianjurkan untuk pasien dengan penyakit diabetes atau penyakit lainnya yang dapat menyebabkan kerusakan testis (Oberoi et al., 2014).

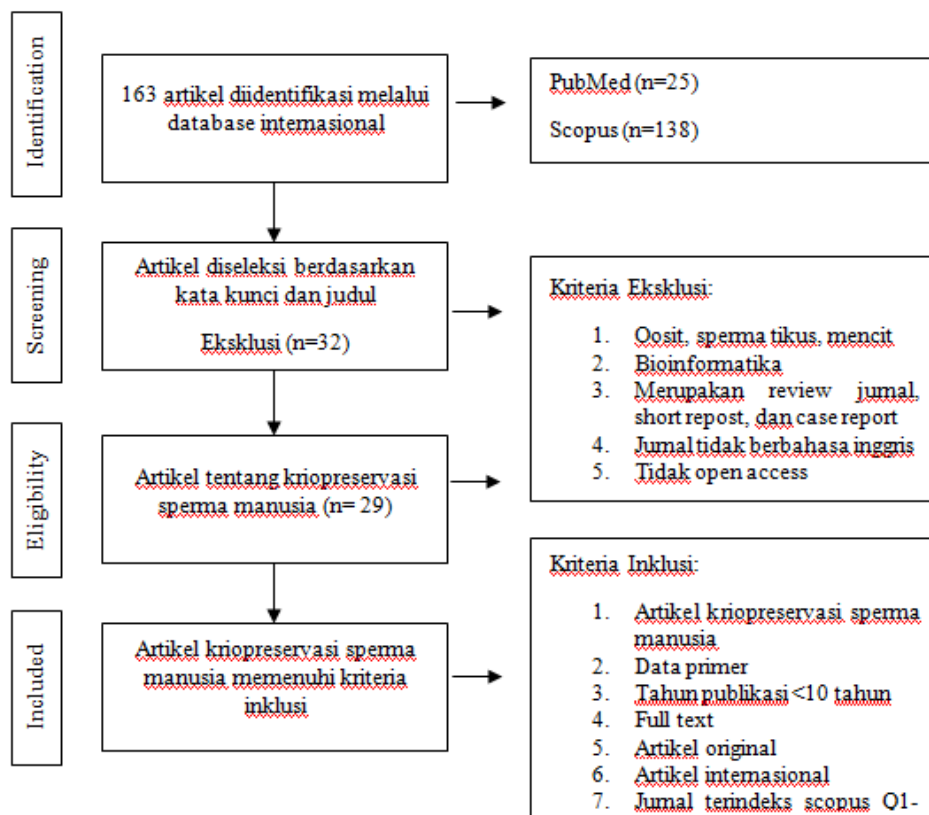
Meskipun memiliki berbagai manfaat, kriopreservasi juga berefek yang merugikan pada spermatozoa. Selain kriopreservasi menyebabkan perubahan struktural dan fungsional, juga dapat berdampak negatif yang ditimbulkan oleh

proses pembekuan atau pencairan pada DNA (Valcarce et al., 2013). Peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) selama proses kriopreservasi menjadi penyebab utama perubahan DNA daripada proses lain seperti apoptosis. ROS mempengaruhi integrasi DNA yang berdampak pada *abasic sites*, *cross-linking*, dan modifikasi basa nitrogen atau kerusakan untai DNA.

Adanya kerusakan DNA pada *germ line* jantan telah dikaitkan dengan berbagai hasil yang merugikan seperti rendahnya tingkat pembuahan, penurunan implantasi embrio, keguguran, kanker, dan penyakit lainnya. Selain itu, kerusakan DNA sperma juga berhubungan dengan peningkatan risiko kehilangan kehamilan setelah *assisted reproductive technologies* (ART) seperti *in vitro fertilization* (IVF) atau *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) (Valcarce et al., 2013). Berdasarkan pernyataan tersebut maka dilakukan tinjauan sistematis untuk mengidentifikasi jenis metode dan efek kriopreservasi sperma manusia.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penulisan ini adalah review literatur. Sumber pustaka yang digunakan dalam penyusunan artikel review ini dengan *literature review* ini melalui Website Jurnal Internasional seperti, PubMed dan Scopus. Menggunakan keyword *Cryopreservation*, *Human* dan *Sperm*. Untuk memilih artikel yang digunakan dalam penulisan, diperlukan kriteria inklusi dan eksklusi berdasarkan tahun publikasi, bahasa, tipe literatur, tipe sumber, dan open access. Selain itu, topik penelitian juga diseleksi dengan cara screening judul dan abstrak artikel penelitian.



Gambar 1. Diagram PRISMA dalam Pemilihan Artikel

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian mengenai jenis metode Kriopresevasi Sperma ditunjukkan pada Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Jenis Metode Kriopreservasi Sperma

Metode	Cara kerja	Hasil	Referensi
Metode dengan kapsul agarosa	1 sperma manusia disuntikkan ke dalam kapsul dengan metode ICSI konvensional. Kemudian dikriopreservasi di atas lembaran polikarbonat atau nilon menggunakan uap nitrogen. Sebelum digunakan, kapsul dicairkan dan ditutup kembali. Spermatozoa motil dalam kapsul dihitung.	Kapsul yang berisi spermatozoa dengan dinding agarosa tidak rusak setelah dipulihkan. Tingkat pemulihan dan motilitas sperma cukup tinggi.	(Araki et al., 2015)
Metode <i>ultra-rapid freezing</i> dan <i>slow freezing</i>	Percobaan 1: 24 sampel semen digunakan untuk membandingkan tingkat pemulihan sperma setelah <i>ultra-rapid freezing</i> dan <i>slow freezing</i> . Percobaan 2: 18 sampel semen digunakan untuk membandingkan tingkat fragmentasi DNA sperma pasca-pencairan masing-masing teknik kriopreservasi.	<i>Ultra-rapid freezing</i> sperma dapat menjadi pilihan daripada <i>slow freezing</i> dengan hasil pemulihan yang lebih baik dan kerusakan DNA yang lebih sedikit.	(Riva et al., 2018)
Metode <i>ultra-low temperature refrigerator store</i> dan <i>liquid nitrogen store</i>	200 mikroliter semen di transfer ke 1 ml cryovials di simpan dalam suhu -20 °C selama 8 jam setelah itu dipindahkan ke penyimpanan -80 °C. 200 mikroliter semen di transfer ke 1 ml cryovials disimpan di campur 100 mikromili (2:1 v/v) <i>test-yolk buffer</i> (14% glycerol, 30% <i>egg yolk</i> , 1.98% <i>glucose</i> , dan 1.72% sodium citrate, pH 7.5) disimpan dalam suhu -20 °C selama 8 jam setelah itu dipindahkan ke penyimpanan -80 °C dan disimpan dalam <i>liquid nitrogen</i> .	Menyimpulkan bahwa penyimpanan sampel sperma yang rapi pada suhu -80 °C menyebabkan kerusakan yang lebih ringan pada DNA sperma daripada penyimpanan pada suhu -196 °C yang dicampur dengan krioprotektan.	(Liu et al., 2016)
Suplementasi protein TAT-PRDX2 pada media kriopreservasi	Sampel semen dibagi menjadi tiga alikuot yaitu segar, kontrol kriopreservasi (tanpa aditif), dan kriopreservasi dengan protein TAT-PRDX2.	Protein TAT-PRDX2 efektif memberikan efek krioprotektif pada spermatozoa dengan mengurangi tingkat ROS intraseluler.	(Liu et al., 2018)

	Dilakukan pengukuran motilitas, viabilitas, potensi mitokondria, dan kerusakan DNA, serta tingkat ROS sperma.		
Penerapan getaran ultrasonik/ <i>ultrasonic vibration</i> (ULV)	Dilakukan evaluasi sifat fisikokimia air dengan periode waktu yang berbeda dengan frekuensi ULV 28 kHz. Sampel semen kemudian diencerkan dengan media pembekuan yang mengandung air yang terpapar ULV dan selanjutnya dikriopreservasi.	Perubahan sifat fisikokimia medium pembekuan kriopreservasi sperma manusia dengan menggunakan ULV dapat meningkatkan kualitas produk beku	(Dariush et al., 2019)
Kriopreservasi menggunakan canthaxanthin pada proses <i>freeze-thaw</i>	Mengevaluasi efek dari canthaxanthin pada parameter sperma manusia selama proses pembekuan-pencairan	Sepuluh mikromolar canthaxanthin secara signifikan meningkatkan motilitas total, viabilitas, normal morfologi, pengemasan kromatin, integritas akrosom dan denaturasi DNA dan fragmentasi	(Najafi et al., 2019)

Hasil tinjauan sistematis mengenai efek kriopreservasi sperma ditunjukkan pada Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Efek Kriopreservasi Sperma

Metode	Efek	Referensi
Analisis semen dilakukan dengan pedoman WHO untuk 25 sampel. Sampel tersebut dicuci, dianalisis, dan dibekukan dengan nitrogen cair. Sampel semen kemudian dicairkan (<i>thawing</i>) dan dianalisis dengan cara yang sama setelah 20 menit dan 40 menit pencairan. Setelah itu dilakukan analisis statistik dari motilitas komparatif	Motilitas sperma menurun setelah kriopreservasi namun, setelah <i>thawing</i> terjadi peningkatan yang signifikan dalam motilitas sperma	(Oberoi et al., 2014)
Sampel semen 30 pria dianalisis dalam keadaan segar dan kriopreservasi dengan uji Comet alkali dan netral	Uji Comet alkali: terdapat peningkatan sekitar 10% dari <i>single-strand Sperm DNA Fragmentation</i> (ssSDF) terlepas dari status kesuburan pria Uji Comet netral: <i>double-strand Sperm DNA Fragmentation</i> (dsSDF) tidak meningkat	(Ribas-Maynou et al., 2014)
Pendekatan gen kandidat dengan mengukur jumlah lesi yang dihasilkan oleh pembekuan atau pencairan gen-gen kunci (PRM1, BIK, FSHB, PEG1/MEST, ADD1, ARNT, UBE3A, SNORD116/	Kriopreservasi yang secara rutin digunakan menghasilkan lesi DNA	(Valcarce et al., 2013)

PWSAS) dengan menggunakan PCR kuantitatif		
Aditif baru <i>extract coleomic Holotheria parva</i> , sebagai krioprotektan dan mencegah stress oksidatif.	Penambahan <i>extract coleomic Holotheria parva</i> sebagai krioprotektan meningkatkan parameter sperma, mengurangi ROS, kerusakan DNA dan menaikkan kemampuan fertilitas dari sperma	(Khashavi et al., 2020)
Suplementasi Melatonin dan Kafein sebagai agen krioprotektan dalam menaikkan efek survival, viabilitas, motilitas pasca <i>thawing</i> sperma manusia	Peningkatan yang signifikan pada kelompok Kafein dan Kafein + Melatonin terhadap motilitas dan aktivitas mitokondria	(Pariz et al., 2019)
Pengujian pre dan post pemanasan vakuola kepala spermatozoa dengan <i>Motile Sperm Organelle Morphology Examination</i> (MSOME), menguji fragmentasi DNA, dan potensial membran mitokondria	Mempengaruhi vakuolisasi spermatozoa, struktur DNA, dan potensial membran mitokondria	(Etebary et al., 2018)
Efek penggunaan <i>Platelet-Rich Plasma</i> (PRP) autologus terhadap kualitas sperma manusia selama proses	<i>Platelet-Rich Plasma</i> (PRP) autologus memiliki sebagian efek terhadap kriopreservasi sperma manusia	(Yan et al., 2021)
Pengujian trehalosa dan sukrosa terhadap motilitas, vitalitas, dan morfologi sperma setelah kriopreservasi	Trehalosa sebagai krioprotektan non permeabel pada pemberian 50mM memiliki efek lebih baik daripada sukrosa dengan adanya pengujian terhadap motilitas, vitalitas dan Morfologi sperma pasca kriopreservasi	(Suksai & Dhanaworavibul, 2019)

PEMBAHASAN

Spermatozoa manusia mengalami berbagai tahap pendinginan dan pemanasan selama penyimpanan semen. Sperma relatif kurang sensitif terhadap kerusakan sel yang terjadi selama pendinginan awal yang cepat, disebabkan oleh fluiditas membran yang meningkat karena kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi pada lapisan lipid sel sperma (Oberoi et al., 2014).

Berbagai teknik telah digunakan untuk menilai kerusakan DNA sperma dalam kriopreservasi seperti TUNEL dan uji Comet. Uji Comet sperma dilakukan untuk membedakan antara kedua jenis kerusakan DNA tergantung pada apakah uji ini dilakukan dengan denaturasi alkali sebelumnya atau dengan kondisi netral. Uji Comet memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dari uji SCD karena komponen elektroforesis dari uji sebelumnya. Tes SCD memiliki sensitivitas yang sama dengan tes TUNEL dan SCSA (Ribas-Maynou et al., 2014).

Jenis Metode Kriopreservasi

Metode kriopreservasi *single* sperma menggunakan kapsul agarosa dapat diterapkan melalui ICSI pada pasien dengan spermatozoa yang sedikit. Gel agarosa memiliki struktur jala dan dapat segera diserap oleh larutan krioprotektan. Sperma dapat dibekukan dalam kapsul agarosa dengan merendamnya selama beberapa menit. Selain itu, perangkat yang digunakan untuk pengawetan sperma tidak menjadi racun bagi sel mamalia, maka bahan gel agarosa memiliki toksisitas

yang rendah. Metode pemindahan juga harus dipertimbangkan dalam kriopreservasi (Araki et al., 2015). Jika terdapat banyak spermatozoa, transfer dapat dilakukan dengan menggunakan pipet secara berkelompok, namun jika hanya ada satu atau beberapa spermatozoa, pipet tidak dapat digunakan. Oleh karena itu, beberapa spermatozoa biasanya ditransfer dengan pipet injeksi untuk ICSI. Setelah diinjeksi ke dalam kapsul agarosa digunakan pipet kaca. Metode ini memungkinkan spermatozoa dipindahkan melalui beberapa jenis larutan yang berbeda (Araki et al., 2015). Tingkat pemulihan dan kelangsungan hidup sperma yang menggunakan *mesh sheet* (MS) cukup baik (Araki et al., 2015).

Berdasarkan penelitian Riva et al., (2018), *ultra-rapid freezing* sperma manusia dengan krioprotektan *non-permeable* lebih efektif dan lebih aman dibandingkan dengan teknik *slow freezing* yang saat ini digunakan. Motilitas berhubungan dengan integritas DNA sperma. Motilitas pasca pencairan lebih tinggi pada metode *ultra rapid freezing* dibandingkan dengan *slow freezing*, kemungkinan karena DNA dari sperma yang telah divitrifikasi mengalami lebih sedikit kerusakan saat *ultra-rapid freezing* dan diberikan krioprotektan *non-permeable* dengan konsentrasi yang rendah. Hal tersebut juga didukung dari hasil integritas DNA yang diuji dengan teknik TUNEL (Riva et al., 2018). Telah ditemukan bahwa tingkat fragmentasi DNA yang lebih tinggi dan motilitas sperma lebih rendah setelah pencairan ketika metode kriopreservasi *slow freezing* digunakan.

Faktor lain yang mempengaruhi motilitas sperma setelah pembekuan yaitu perubahan membran sperma, kerusakan mitokondria, dan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) (Riva et al., 2018). Pada penelitian Liu et al., (2016) melakukan *ultra-slow freezing* dan *rapid freezing* memiliki perbedaan langkah pada perlakuan dimana *rapid freezing* melalui tahapan yang sama pembekuan dengan *ultra-slow freezing* dan juga pemberian jenis krioprotektan yang diberikan untuk *rapid freezing*. Penelitian tersebut tidak sama dengan penelitian Riva et al., (2018) sukrosa dan SSS, hal ini adanya juga pengaruh pemberian krioprotektan yang tepat untuk dapat menjaga jaringan dan organ agar tetap dalam keadaan normal agar meminimalisir kerusakan pada DNA sperma.

Kriopreservasi membutuhkan perlindungan struktur intraseluler dan biomolekul sebagai agen pelindung yang dapat melewati membran sel. Protein TAT dari HIV-1 memiliki kemampuan untuk menghantarkan protein heterolog secara in vivo maupun in vitro. Penambahan TAT-PRDX2 ke media pembekuan secara signifikan meningkatkan motilitas progresif sperma pasca pencairan, motilitas total, dan viabilitas kelompok normozoospermik dan asthenozoospermik. Namun efek perlindungan untuk DNA dan integritas mitokondria hanya pada kelompok normozoospermik dan asthenozoospermik. Namun efek perlindungan untuk DNA dan integritas mitokondria hanya pada kelompok asthenozoospermik. Kadar DFI dan ROS yang tinggi serta penurunan perlindungan oleh protein PRDX2 pada semen segar dari pria dengan asthenozoospermik menyebabkan sperma lebih rentan *cryoinjury*, namun lebih baik daripada spermatozoa dari pria yang normozoospermik (Liu et al., 2018).

Peningkatan kualitas sperma pasca pencairan yang dikriopreservasi dalam media pembekuan yang mengandung molekul air yang terpapar ULV berhubungan dengan pembentukan dan pertumbuhan kavitas gelembung. ULV dapat menginisiasi dan menginduksi nukleasi es di dalam air dan larutan berair

yang didinginkan pada suhu yang sangat dingin untuk jangka panjang. Hal tersebut menyebabkan terjadinya kavitasi akustik dan dapat merusak morfologi kristal es khususnya bentuk dan ukurannya. Perubahan bentuk kristal es amorf ini mengakibatkan berkurangnya kerusakan pada sperma selama kriopreservasi. Meskipun begitu, paparan langsung sperma terhadap ULV memiliki efek yang merugikan pada parameter sperma seperti jumlah, persen motilitas, dan morfologi normal (Dariush et al., 2019).

Perkembangan dari ilmu kriopreservasi untuk menjaga kualitas sperma manusia agar bisa menjalankan prosedur *in vitro fertilisation*. Selama kriopreservasi biasanya terdapat kejutan dingin atau dikenal dengan *Cold shock* yang akan berhubungan dengan osmotik stress yang merupakan penyebab *stress oxidative*. *Stress oxidative* merupakan langkah awal terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) yang akan merusak membran sperma hingga merusak motilitas, vitalitas hingga fragmentasi DNA. Antioksidan diperlukan untuk bisa menjaga sel dari stress oksidatif. Salah satunya Canthaxanthin yang merupakan karotenoid diproduksi secara alami oleh ganggang, jamur, dan bakteri. Hal ini juga disintesis di dalam tubuh oleh mikroorganisme, terutama *Escherichia coli*. Pada penelitian Najafi et al., (2019) meninjau efek dari pemberian canthaxanthin yang dicampurkan kedalam media sel sperma canthaxanthin yang dapat meningkatkan parameter sperma seperti motilitas, viabilitas, integritas akrosom, morfologi dan integritas DNA setelah kriopreservasi. Efek ini mungkin disebabkan oleh kinerja canthaxanthin dalam menjaga integritas membran, membersihkan radikal bebas, menekan aktivitas caspase-3 dan meningkatkan aktivitas antioksidan seperti superoksida dismutase.

Efek Kriopreservasi Sperma

Kerusakan oleh Kriopreservasi (*cryoinjury*) tidak hanya terbatas pada proses pembekuan, tetapi juga dapat terjadi selama proses pencairan (*thawing*) saat es mencair atau mengkristal kembali (Oberoi et al., 2014). Penurunan motilitas spermatozoa berkaitan dengan kerusakan membran mitokondria. ATP yang dihasilkan oleh fosforilasi oksidatif pada membran mitokondria bagian dalam ditransfer ke mikrotubulus untuk menggerakkan motilitas. Oleh karena itu, penurunan aktivitas mitokondria dapat menurunkan motilitas spermatozoa. Meskipun motilitas tidak secara langsung berkaitan dengan kapasitas pembuahan, namun motilitas merupakan salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi kualitas sperma (Oberoi et al., 2014).

Efek kriopreservasi pada uji Comet alkalin menunjukkan peningkatan 10% single-strand Sperm DNA Fragmentation (ssSDF), sedangkan uji Comet netral tidak menunjukkan efek setelah pencairan (*thawing*). Oleh karena itu, hasil ini menunjukkan bahwa rata-rata 10% sel sperma yang dikriopreservasi memiliki integritas ssDNA yang lebih buruk daripada sebelum kriopreservasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa kriopreservasi dapat mempengaruhi kapasitas kehamilan sel sperma tanpa meningkatkan risiko keguguran (Ribas-Maynou et al., 2014).

Kerusakan DNA dapat memberikan efek pada keturunan seperti apoptosis setelah pembelahan pertama, penurunan implantasi embrio, keguguran, dan penyakit pada bayi baru lahir. Tingkat transkripsi yang berubah untuk berbagai gen yang terlibat dalam pertumbuhan dan diferensiasi. Selain itu, kerusakan DNA

sperma juga dapat meningkatkan risiko keguguran setelah IVF atau ICSI (Valcarce et al., 2013).

Kriopreservasi memiliki efek negatif pada kualitas sperma secara keseluruhan dan meningkatkan produksi ROS. Penambahan agen Krioprotektan yang tepat merupakan salah satu kunci untuk mempertahankan motilitas viabilitas dari sperma pasca vitrifikasi. Adanya penambahan agen krioprotektan yang kurang tepat dikaitkan juga dengan jenis sel yang akan di kriopreservasi serta metode *freezing* yang harus disesuaikan. Seperti penelitian Liu et al., (2016) penambahan agen krioprotektan yang kurang sesuai dengan metode *rapid freezing*. Khashavi et al., (2020) melakukan eksperimen dengan pembuatan agen krioprotektan dari extract coleomic *Holothuria parva* pada dosis extract 250 µg/ml memiliki motilitas sperma dan viabilitas sperma yang tinggi dibandingkan kriopreservasi tanpa menggunakan extract.

Selain extract coleomic *Holothuria parva* ada banyak penelitian yang terus berkembang untuk mengeksplor banyaknya kandidat krioprotektan dalam melindungi kerusakan DNA dan peningkatan ROS pasca *thawing*. Penelitian Pariz et al., (2019) mengenai peningkatan fragmentasi DNA dan produksi ROS pada pasca *thawing* dibandingkan dengan sampel segar. Adanya suplemen kafein dan melatonin memiliki impact yang sangat signifikan dalam menaikkan motilitas sperma pada kelompok suplementasi kafein dan menaikkan aktifitas dari mitokondria pada Kafein + Melatonin grup. Penelitian yang berkembang dengan adanya metode metode untuk kriopreservasi, efek kriopreservasi dan penggunaan krioprotektan harus diperhatikan pada penyimpanan sperma manusia. Hal ini untuk menghindari adanya kerusakan dari sperma manusia akibat tidak sesuaiya metode kriopreservasi yang digunakan dan tidak tepatnya pemilihan agen krioprotektan untuk melindungi sperma manusia dalam penyimpanan kriopreservasi ataupun pada saat pasca *thawing*.

Potensi membran mitokondria menurun hingga hampir 31% setelah vitrifikasi dan pembekuan dalam uap nitrogen cair. Sperma terdiri dari beberapa bagian yang terbungkus di dalam plasma dan membran mitokondria. Membran ini harus tetap utuh dan berfungsi dengan baik untuk menjaga kompetensi sel (Etebary et al., 2018). Mitokondria merupakan organel yang memproduksi ATP yang menjadi sumber utama energi oksidatif sel. Kriopreservasi mengubah komposisi plasma spermatozoa, akrosom, dan membran mitokondria sehingga mempengaruhi reaksi akrosom, interaksi gamet dan fungsi mitokondria. Gangguan membran sperma yang disebabkan oleh kriopreservasi diperkirakan disebabkan oleh perubahan transisi fase cair dan peningkatan peroksidasi lipid (Etebary et al., 2018).

Kriopreservasi merupakan suatu cara untuk mempertahankan integritas dan vitalitas dari sperma manusia. Kriopreservasi selama bertahun-tahun dianggap sebagai metode penyimpanan sperma yang kurang berhasil karena hanya memiliki tingkat kelangsungan hidup pasca kriopreservasi sebesar 40 – 60%. Pembentukan kristal es intraseluler dan guncangan osmotik adalah dua penyebab utama kematian sperma setelah pembekuan dan pencairan. Air intraseluler merupakan komponen utama setiap sel. Sampai saat ini, sukrosa sebagai krioprotektan *non-permeabel* yang paling umum digunakan untuk mengawetkan sperma beku, tetapi penelitian telah menunjukkan bahwa trehalose sebagai krioprotektan *non-permeabel* dan memiliki sedikit manfaat (Suksai & Dhanaworavibul, 2019).

Pada percobaan perbandingan antara menggunakan trehalosa dan sukrosa sebagai krioprotektan *non-permeabel* setelah pasca *thawing* dilakukan evaluasi bahwa penggunaan trehalose 50mM lebih baik daripada penggunaan 50mM sucrose dari segi progresif motilitas (p-value=0.037, total motility (p-value<0.001), vitalitas (p-value<0.001) dan morfologi (p-value<0.001). Dari mekanismenya Trehalose bekerja berikatan dengan membran lemak sel dan membentuk lapisan lipid padat yang stabil. Hal ini membantu menjaga integritas sel dan mengurangi kerusakan sel selama proses pengawetan beku (Suksai & Dhanaworavibul, 2019).

Platelet-rich plasma (PRP), konsentrat trombosit autologus yang unik tiga hingga tujuh kali lebih besar dari konsentrasi fisiologis, adalah digunakan di berbagai bidang medis dan telah memperoleh hasil yang cukup besar efek aplikasi pada ortopedi, dermatologi, stomatologi, olahraga obat-obatan dan reproduksi. Pada penelitian Yan et al., (2021) menambahkan PRP sebagai pengganti agent krioprotektan agar bisa melindungi sel sperma pasca *thawing*, hal hasil PRP memiliki efek perlindungan terhadap vitalitas, progresif motilitas dan total motilitas pada konsentrasi 5% namun pemberian PRP tidak berpengaruh dalam mempertahankan Integritas membran plasma, Potensial membran mitokondria, pencegahan fragmentasi DNA dan *reactive oxygen species* intraseluler.

SIMPULAN

Kriopreservasi sperma manusia dapat menyebabkan kerusakan pada sel sperma, terutama pada membran mitokondria dan DNA. Proses pembekuan dan pencairan sperma dapat mengakibatkan *cryoinjury* dan perubahan komposisi plasma, akrosom, serta membran mitokondria, yang pada gilirannya dapat mempengaruhi motilitas, viabilitas, dan integritas DNA sperma. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa beberapa metode kriopreservasi, seperti *ultra-rapid freezing* dengan krioprotektan *non-permeable*, memiliki hasil yang lebih baik dalam menjaga kualitas sperma setelah pencairan dibandingkan dengan teknik *slow freezing* yang lebih umum digunakan.

Selain itu, penambahan agen krioprotektan yang tepat, seperti TAT-PRDX2, canthaxanthin, atau ekstrak *coleomic Holotheria parva*, dapat meningkatkan motilitas, viabilitas, dan integritas sperma setelah kriopreservasi. Namun, perlu diperhatikan bahwa paparan langsung sperma terhadap *ultra-low vibration* (ULV) dapat memiliki efek merugikan pada parameter sperma. Oleh karena itu, dalam pengembangan metode kriopreservasi, perlu memperhatikan pemilihan metode, penggunaan agen krioprotektan yang sesuai, dan perlindungan terhadap stress oksidatif untuk meminimalkan kerusakan pada sperma manusia selama proses kriopreservasi dan pencairan.

DAFTAR PUSTAKA

- Araki, Y., Yao, T., Asayama, Y., Matsuhisa, A., & Araki, Y. (2015). Single Human Sperm Cryopreservation Method Using Hollow-Core Agarose Capsules. *Fertility and Sterility*, *104*(4), 1004–1009. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.043>
- Dariush, G., Gholamhossein, R., Rouhollah, F., Mahmood, G. S., Abdolhossein, S., Mohsen, S., & Loghman, A. (2019). The Application of Ultrasonic Vibration in Human Sperm Cryopreservation as a Novel Method for the

- Modification of Physicochemical Characteristics of Freezing Media. *Scientific Reports*, 9(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46424-0>
- Etebary, S., Yari, N., Khalili, M. A., Kalantar, S. M., & Anvari, M. (2018). Testicular Human Spermatozoa Cryopreservation Correlation between Sperm Head Vacuoles, DNA Fragmentation and Mitochondrial Membrane Potential. *Middle East Fertility Society Journal*, 23(4), 413–417. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2018.07.001>
- Khashavi, Z., Homaei, A., Kooznavard, F., Kamrani, E., Spinaci, M., Luwor, R. B., Archang, M., Agarwal, A., & Henkel, R. (2020). Novel Additive for Sperm Cryopreservation Media: *Holothuria Parva* Coelomic Cavity Extract Protects Human Spermatozoa Against Oxidative Stress—A Pilot Study. *Andrologia*, 52(6). <https://doi.org/10.1111/and.13604>
- Liu, J., Wang, W., Liu, X., Wang, X., Wang, J., Wang, Y., Li, N., & Wang, X. (2018). Supplementation of Cryopreservation Medium with TAT-Peroxiredoxin 2 Fusion Protein Improves Human Sperm Quality and Function. *Fertility and Sterility*, 110(6), 1058–1066. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.07.008>
- Liu, T., Gao, J., Zhou, N., Mo, M., Wang, X., Zhang, X., Yang, H., Chen, Q., Ao, L., Liu, J., Cui, Z., & Cao, J. (2016). The Effect of Two Cryopreservation Methods on Human Sperm DNA Damage. *Cryobiology*, 72(3), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.04.004>
- Najafi, L., Halvaei, I., & Movahedin, M. (2019). Canthaxanthin Protects Human Sperm Parameters During Cryopreservation. *Andrologia*, 51(10). <https://doi.org/10.1111/and.13389>
- Oberoi, B., Kumar, S., & Talwar, P. (2014). Study of Human Sperm Motility Post Cryopreservation. *Medical Journal Armed Forces India*, 70(4), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.006>
- Pariz, J. R., Raneá, C., Monteiro, R. A. C., Evenson, D. P., Drevet, J. R., & Hallak, J. (2019). Melatonin and Caffeine Supplementation Used, Respectively, as Protective and Stimulating Agents in the Cryopreservation of Human Sperm Improves Survival, Viability, and Motility after Thawing compared to Traditional TEST-Yolk Buffer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6472945>
- Ribas-Maynou, J., Fernández-Encinas, A., García-Peiró, A., Prada, E., Abad, C., Amengual, M. J., Navarro, J., & Benet, J. (2014). Human Semen Cryopreservation: a Sperm DNA Fragmentation Study With Alkaline and Neutral Comet Assay. *Andrology*, 2(1), 83–87. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00158.x>
- Riva, N. S., Ruhlmann, C., Iaizzo, R. S., López, C. A. M., & Martínez, A. G. (2018). Comparative Analysis Between Slow Freezing and Ultra-Rapid Freezing for Human Sperm Cryopreservation. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 22(4), 331–337. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180060>
- Suksai, M., & Dhanaworavibul, K. (2019). Effects of Trehalose and Sucrose on Human Sperm Motility, Vitality, and Morphology After Cryopreservation. *Journal of Health Science and Medical Research*, 37(2), 101–107. <https://doi.org/10.31584/jhsmr.201945>

- Valcarce, D. G., Cartón-García, F., Riesco, M. F., Herráez, M. P., & Robles, V. (2013). Analysis of DNA Damage After Human Sperm Cryopreservation in Genes Crucial for Fertilization and Early Embryo Development. *Andrology*, 1(5), 723–730. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00116.x>
- Yan, B., Zhang, Y., Tian, S., Hu, R., & Wu, B. (2021). Effect of Autologous Platelet-Rich Plasma on Human Sperm Quality During Cryopreservation. *Cryobiology*, 98, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.009>