

## Efek Pemberian Suplementasi Kombinasi Vitamin C dan Albumin Terhadap Viabilitas Spermatozoa dalam Proses Sentrifugasi (Studi In Vitro)

### Effect of Supplementation of Vitamin C and Albumin Combination on Spermatozoa Viability in Centrifugation (In Vitro Study)

**Maria K. A. Klau, Hudi Winarso, Florence Pribadi**

Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Ciputra, Surabaya, Indonesia

Email: [hudi.winarso@ciputra.ac.id](mailto:hudi.winarso@ciputra.ac.id)

Received: November 11, 2023; Accepted: February 8, 2024, 2023; Published online: February 10, 2024

**Abstract:** Sperm centrifugation is an important process to obtain good spermatozoa for assisted reproductive techniques. However, the centrifugation process has additional impacts such as increased reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress affecting sperm viability due to damage of spermatozoa membrane. The use of vitamin C (ascorbic acid) can reduce elevated ROS levels, thereby protecting DNA and spermatozoa from damage caused by oxidative stress, meanwhile albumin can reduce oxidative stress and maintain the integrity of spermatozoa membrane. This study aimed to obtain the effect of combination of vitamin C and albumin on spermatozoa viability in centrifugation process. This was a true experimental in vitro study using post-test-only control design. There were four groups in this study, as follows: the control group (K); the treatment group (P1), centrifugation without vitamin C and albumin; (P2), centrifugation with vitamin C; and (P3), centrifugation with a combination of vitamin C and albumin. The Mann-Whitney test for each group showed significantly differences in spermatozoa viability ( $p < 0.05$ ) among them. The treatment group receiving supplementation with a combination vitamin C and albumin produced the highest viability after the control group. In conclusion, supplementation of combination of vitamin C and albumin is capable in maintaining spermatozoa in centrifugation process.

**Keywords:** assisted reproduction technique; centrifugation; spermatozoa viability; supplementation

**Abstrak:** Sentrifugasi sperma merupakan proses penting untuk mendapatkan spermatozoa yang baik dalam keperluan teknik bantu reproduksi, namun proses sentrifugasi memberi dampak lain yaitu terjadinya peningkatan *reactive oxygen spesies* (ROS) dan stres oksidatif yang memengaruhi viabilitas spermatozoa akibat rusaknya membran spermatozoa. Pemberian vitamin C (asam askorbat) dapat menurunkan kadar ROS yang meningkat sehingga melindungi DNA dan spermatozoa dari kerusakan akibat stres oksidatif sedangkan albumin mampu mengurangi stres oksidatif dan mempertahankan integritas membran spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh kombinasi vitamin C dan albumin terhadap viabilitas spermatozoa. Jenis penelitian ialah *true experimental in vitro* menggunakan *post test only control design* dengan pengamatan pada kelompok kontrol (K); kelompok perlakuan (P1) sentrifugasi tanpa vitamin C dan albumin; (P2) sentrifugasi dengan vitamin C; dan (P3) sentrifugasi dengan kombinasi vitamin C dan albumin. Hasil uji Mann-Whitney dari masing-masing kelompok menunjukkan viabilitas spermatozoa yang berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ) antar satu sama lain. Kelompok perlakuan yang mendapat suplementasi kombinasi vitamin C dan albumin menghasilkan viabilitas tertinggi setelah kelompok kontrol. Simpulan penelitian ini ialah suplementasi kombinasi vitamin C dan albumin mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa dalam proses sentrifugasi.

**Kata kunci:** teknik bantu reproduksi; sentrifugasi; viabilitas spermatozoa; suplementasi

## PENDAHULUAN

*Assisted reproduction technique* (ART) seperti *in-vitro fertilization* (IVF) dan *intra uterine insemination* (IUI) dapat menjadi solusi untuk membantu terjadinya fertilisasi.<sup>1</sup> Pada teknik bantu reproduksi dilakukan preparasi sperma dan membutuhkan sentrifugasi untuk memisahkan plasma seminal dan spermatozoa, tetapi pada proses sentrifugasi terjadi peningkatan *reactive oxygen spesies* (ROS) yang memengaruhi kualitas spermatozoa.<sup>2</sup> Peningkatan ROS menghasilkan stres oksidatif yang merusak sperma sehingga memengaruhi viabilitas spermatozoa.<sup>3</sup>

Stres oksidatif muncul ketika pembentukan ROS yang tidak seimbang mengalahkan proses detoksifikasi. ROS menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, asam nukleat dan protein.<sup>4</sup> Peroksidasi lipid mengubah struktur asam nukleat, protein, dan lipid pada membran sel sperma, kemudian mengubah integritas dan permeabilitas membran sel, serta merusak DNA spermatozoa yang memicu apoptosis sel sperma.<sup>5</sup>

Vitamin C (asam askorbat) dapat menurunkan peningkatan kadar ROS sehingga melindungi DNA (*Deoxyribose nucleic acid*) dan spermatozoa akibat stres oksidatif.<sup>6</sup> Serum albumin mampu menurunkan stres oksidatif akibat peningkatan ROS serta membantu melindungi sperma selama proses teknik bantu reproduksi. Albumin memberikan korelasi positif terhadap konsentrasi dan morfologi normal sperma.<sup>7</sup> Konjugasi asam askorbat dengan serum albumin (serum protein) dalam metode spektroskopi, analisis termodinamika, dan permodelan menunjukkan kemanjuran antara ikatan kedua komponen ini melalui konjugasi asam-protein.<sup>8</sup> Vitamin C mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa.<sup>9</sup> Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan maka penulis terdorong untuk meneliti efektivitas pemberian vitamin C, kombinasi vitamin C dan albumin terhadap viabilitas spermatozoa untuk membantu mengurangi kerusakan membran spermatozoa dalam proses sentrifugasi terkait preparasi sperma untuk teknik bantu reproduksi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental murni secara *in vitro* yang bertujuan untuk meneliti efek suplementasi vitamin C, serta kombinasi vitamin C dan albumin terhadap viabilitas spermatozoa dalam proses sentrifugasi. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Ciputra dan sudah mendapat surat keterangan laik etik (*Ethical Clearance*) Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Ciputra No. 083/EC/KEPK-FKUC/IX/2023 sebagai syarat melaksanakan penelitian.

Desain penelitian yang digunakan yaitu *post test only control design*. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini ialah sperma dengan volume > 2 ml dan konsentrasi spermatozoa >10 jt/ml. Klasifikasi variabel penelitian terdiri dari variabel bebas, yaitu vitamin C, kombinasi vitamin C dan albumin; variabel terikat ialah viabilitas spermatozoa; dan variabel kontrol ialah sentrifugasi. Kriteria inklusi dalam pemilihan sampel penelitian yaitu sperma pria dengan volume >2 ml dan konsentrasi >10 jt/ml. Bahan penelitian ialah *human sperm*, vitamin C 80%, albumin 20%, Nacl 0,9%, zat warna eosin 3%. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa dalam penelitian ini sesuai dengan standar WHO (*World Health Organization*) *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen Sixth Edition 2021*.

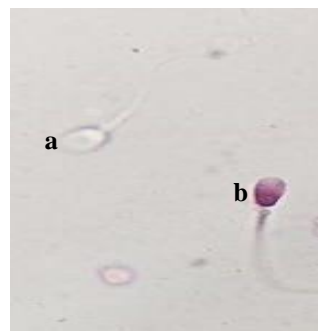
Pengamatan dilakukan setelah pemberian perlakuan pada empat kelompok, yaitu satu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari enam sampel. Sampel yang memenuhi kriteria inklusi dibagi menjadi empat kelompok, yang terdiri dari satu kelompok kontrol (K) yaitu kelompok sperma yang tidak diberi perlakuan dan sentrifugasi dan tiga kelompok perlakuan yaitu P1, kelompok perlakuan sperma yang tidak ditambahkan vitamin C, kombinasi vitamin C dan albumin dengan sentrifugasi; P2, kelompok perlakuan sperma yang ditambahkan vitamin C (80%) 1,5 mL dengan sentrifugasi; dan P3, kelompok perlakuan sperma yang ditambahkan kombinasi vitamin C (80%) 1,5 ml dan albumin (20%) 1000 µL. Kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm dalam waktu 10 menit, kemudian dilakukan *vital staining* dengan pewarnaan eosin-nigrosin untuk meningkatkan kontras latar belakang dan kepala sperma yang dibaca pada mikroskop dengan pembesaran 1000x

untuk melihat spermatozoa yang hidup dan spermatozoa yang mati, setelah itu dihitung sebanyak 200 spermatozoa untuk pemeriksaan viabilitas spermatozoa.

Analisis data penelitian pada sperma yang telah diberi perlakuan menggunakan ketentuan masing-masing kelompok diuji dengan program *Statistical Product and Service Solution* (SSPS) versi 26.0. Perbedaan viabilitas spermatozoa dari keempat perlakuan dianalisis dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

**HASIL PENELITIAN**

Gambar 1 memperlihatkan hasil *vital staining* merupakan presentase spermatozoa yang hidup (viabilitas) dinilai berdasarkan identifikasi membran spermatozoa yang utuh dimana pada pewarnaan eosin-nigrosin, zat tidak menembus membran ditandai dengan kepala spermatozoa berwarna putih, sedangkan membran spermatozoa yang rusak memungkinkan eosin masuk ke dalam kepala spermatozoa yang mati ditandai dengan warnah merah muda pada kepala spermatozoa.<sup>10</sup>



**Gambar 1.** Hasil *vital staining*, a: spermatozoa hidup, b: spermatozoa mati

Tabel 1 memperlihatkan bahwa kelompok kontrol memiliki rerata jumlah sel hidup spermatozoa sebanyak 182,67±1,75. Setelah kelompok kontrol, kelompok dengan persentase rerata viabilitas paling tinggi ialah kelompok P3 yaitu kelompok perlakuan sperma yang ditambahkan kombinasi vitamin C (80%) dan 1,5 ml dan albumin (20%) 1000 µL. Kelompok P3 memiliki persentase rerata viabilitas spermatozoa (86,92%) tertinggi dibandingkan P1 dan P2.

**Tabel 1.** Uji Kruskal-Wallis viabilitas spermatozoa

Perlakuan	n	Median	Persentase rerata viabilitas	SD	p
Kontrol	6	91,25	91,33	0,88	0,000*
P1	6	22,25	24,33	4,47	
P2	6	76,75	76,58	3,63	
P3	6	87,25	86,92	1,59	

Keterangan:

- K: kelompok kontrol sperma yang tidak diberikan vitamin C atau kombinasi vitamin C dan albumin, tanpa sentrifugasi
- P1: kelompok kontrol sperma yang tidak diberikan vitamin C atau kombinasi vitamin C dan albumin, dengan sentrifugasi
- P2: Kelompok sperma yang diberikan vitamin C (80%) 1,5 mL
- P3: Kelompok sperma yang diberikan kombinasi vitamin C (80%) 1,5 mL dan albumin (20%) 1000 µL

Tabel 2 memperlihatkan hasil analisis data uji Kruskal-Wallis dan uji Mann-Whitney yang menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki viabilitas spermatozoa yang berbeda bermakna dengan kelompok P1, P2, dan P3 (p<0,05). Kelompok P1 memiliki viabilitas spermatozoa yang berbeda bermakna dengan kelompok P2 dan P3 (p<0,05). Kelompok P2 memiliki viabilitas spermatozoa yang berbeda bermakna dengan kelompok P3 (p<0,05).

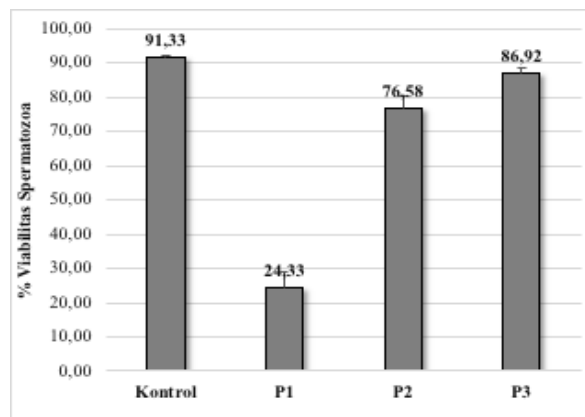
**Tabel 2.** Hasil uji Mann-Whitney terhadap viabilitas spermatozoa

Perlakuan	Kontrol	P1	P2	P3
Kontrol				
P1	0,002*			
P2	0,004*	0,004*		
P3	0,004*	0,004*	0,004*	

Keterangan:

- K: kelompok kontrol sperma yang tidak diberikan vitamin C atau kombinasi vitamin C dan albumin, tanpa sentrifugasi
- P1: kelompok kontrol sperma yang tidak diberikan vitamin C atau kombinasi vitamin C dan albumin, dengan sentrifugasi
- P2: Kelompok sperma yang diberikan vitamin C (80%) 1,5 mL
- P3: Kelompok sperma yang diberikan kombinasi vitamin C (80%) 1,5 mL dan albumin (20%) 1000 µL

Gambar 2 memperlihatkan bahwa kelompok P3 (perlakuan sperma yang ditambahkan kombinasi vitamin C (80%) 1,5 ml dan albumin (20%) 1000 µL) menghasilkan viabilitas spermatozoa paling tinggi setelah kontrol. Kelompok P2 yaitu kelompok perlakuan sperma yang ditambahkan vitamin C (80%) 1,5 ml memiliki viabilitas spermatozoa lebih rendah dibandingkan dengan kelompok P3 yang diberi albumin (20%) 1000 µL.



**Gambar 2.** Grafik viabilitas spermatozoa

Keterangan:

- K: kelompok kontrol sperma yang tidak diberikan vitamin C atau kombinasi vitamin C dan albumin, tanpa sentrifugasi
- P1: kelompok kontrol sperma yang tidak diberikan vitamin C atau kombinasi vitamin C dan albumin, dengan sentrifugasi
- P2: Kelompok sperma yang diberikan vitamin C (80%) 1,5 mL
- P3: Kelompok sperma yang diberikan kombinasi vitamin C (80%) 1,5 mL dan albumin (20%) 1000 µL

**BAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas kombinasi vitamin C dan albumin terhadap viabilitas spermatozoa akibat sentrifugasi selama proses preparasi sperma. Hasil analisis uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa berdasarkan nilai rerata diperoleh kelompok P3 perlakuan sperma yang ditambahkan kombinasi vitamin C (80%) 1,5 ml dan albumin (20%) 1000 µL merupakan kelompok yang memiliki viabilitas tertinggi setelah kontrol.

Viabilitas spermatozoa merupakan jumlah daya hidup spermatozoa yang memiliki warna putih atau transparan di kepala pada pewarnaan eosin dan nigrosine.<sup>11</sup> Viabilitas normal atau spermatozoa yang hidup pada pewarnaan spermatozoa terlihat translusen, dan bagian kepala tidak berwarna sedangkan viabilitas yang tidak normal atau spermatozoa yang mati ditandai dengan bagian kepala sperma yang berwarna merah karena permeabilitas membran kepala yang rusak.<sup>12</sup>

Sentrifugasi pada teknik bantu reproduksi memberikan efek lain yaitu menyebabkan peningkatan ROS sehingga memengaruhi kualitas spermatozoa.<sup>2</sup> ROS menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, asam nukleat, dan protein.<sup>4</sup> Peroksidasi lipid mengubah struktur asam nukleat, protein, dan lipid pada membran sel sperma, kemudian mengubah integritas dan permeabilitas

membran sel, serta merusak DNA spermatozoa yang memicu apoptosis sel sperma.<sup>5</sup> Paparan ROS merusak membran plasma spermatozoa sehingga zat warna eosin nigrosin dapat masuk ke dalam membran.<sup>13</sup>

Vitamin C (asam askorbat) menurunkan peningkatan kadar ROS sehingga melindungi DNA dan spermatozoa akibat stress oksidatif. Sifat polaritas vitamin C yang tinggi memungkinkannya untuk langsung bereaksi dengan radikal hidroksil, superoksida, dan hidrogen peroksida.<sup>6</sup> Albumin berperan dalam mempertahankan tekanan osmotik plasma, mengangkut vitamin, asam lemak, empedu, dan menyerap racun.<sup>14</sup> Selain itu, albumin bekerja melawan oksidasi dan mempertahankan integritas membran.<sup>15</sup> Pada prinsip preparasi sperma albumin serum dirancang khusus untuk prosedur ART. Albumin yang digunakan harus memenuhi standar yaitu bebas dari kontaminasi virus dan bakteri sehingga steril dan dapat menjadi aplikasi terapeutik. Albumin menjadi reagen pada setiap metode preparasi sperma.<sup>10</sup>

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Raad et al<sup>16</sup> dengan prosedur *swim up* yang menggunakan sentrifugasi untuk preparasi sperma. Pemisahan spermatozoa motil dengan semen yang memiliki antioksidan tinggi menyebabkan spermatozoa lebih mudah dipengaruhi oleh ROS. Penggunaan vitamin C pada metode *swim up* mampu menurunkan kadar ROS sperma. Penambahan antioksidan meningkatkan ketahanan spermatozoa terhadap paparan ROS. Tanpa pemberian antioksidan, ROS yang meningkat akan menyebabkan rusaknya membran plasma sel sehingga menurunkan persentase viabilitas spermatozoa.<sup>13</sup> Inovasi dalam penelitian ini ialah kombinasi pemberian vitamin C dan albumin untuk menjaga viabilitas spermatozoa. Pada kelompok yang menerima kombinasi albumin dan vitamin C terbukti dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa seperti pada kelompok yang tidak di sentrifugasi, serta jumlah spermatozoa hidup juga mendekati kelompok kontrol. Penelitian ini membuktikan bahwa kombinasi vitamin C (80%) 1,5 ml dan albumin (20%) 1000 µL menghasilkan viabilitas spermatozoa paling tinggi setelah kelompok kontrol.

## SIMPULAN

Kombinasi vitamin C (80%) 1,5 ml dan albumin (20%) 1000 µL terbukti efektif mempertahankan viabilitas spermatozoa manusia.

## Konflik Kepentingan

Peneliti menyatakan tidak memiliki konflik kepentingan dalam studi ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Chiu YH, Yland JJ, Rinaudo P, Hsu J, McGrath S, Hernández-Díaz S, et al. Effectiveness and safety of intrauterine insemination vs. assisted reproductive technology: emulating a target trial using an observational database of administrative claims. *Fertil Steril.* 2022;117(5):981–91. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.02.003
2. Salam LM, Rahim AI, Al-Kawaz UM. Which is matter in centrifugation based Reactive Oxygen Species (ROS) production? force or time? *EurAsian Journal of BioSciences Eurasia J Biosci [Internet].* 2020;14:6405–8. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/349053536>
3. Rusman K. Pengaruh aktivitas merokok terhadap hasil analisa sperma pada kasus infertilitas pria di Makassar. *UMI Medical Journal.* 2019;4(2):50–62. Doi: <https://doi.org/10.33096/umj.v4i2.70>
4. Winarso H. Strategi Mencegah Dan Mengelola Penurunan Kualitas Sperma Pria. Surabaya: Universitas Ciputra; 2021.
5. Dwizella N, Rahmanisa S, Sari RDP. Efek protektif pemberian ekstrak etanol 96% bekatul beras merah terhadap jumlah rerata spermatosit primer dan ketebalan tubulus seminiferus tikus putih jantan galur Sprague Dawley yang terpapar asap rokok kretek. *Majority.* 2019;8(2):173-80. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/344177261...>
6. Awuy FD, Purwanto DS, Mewo YM. Pengaruh pemberian vitamin C terhadap kualitas spermatozoa yang terpapar asap rokok. *eBiomedik.* 2021;9(2). Doi: <https://doi.org/10.35790/ebm.v9i2.33451>
7. Ribeiro JC, Braga PC, Martins AD, Silva BM, Alves MG, Oliveira PF. Antioxidants present in

- reproductive tract fluids and their relevance for fertility. *Antioxidants*. 2021;10(9):1441. Doi: 10.3390/antiox10091441
8. Chanphai P, Tajmir-Riahi HA. Conjugation of vitamin C with serum proteins: a potential application for vitamin delivery. *Int J Biol Macromol*. 2019 Sep;137:966–72. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.059
  9. Qamar AY, Naveed MI, Raza S, Fang X, Roy PK, Bang S, et al. Role of antioxidants in fertility preservation of sperm — a narrative review. *Anim Biosci*. 2023;36(3):385–403. Doi: 10.5713/ab.22.0325
  10. World health organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (6th ed). Björndahl LMP, editor. Department of Sexual and Reproductive Health and Research of the World Health Organization (which includes the UNDP/ UNFPA/UNICEF/WHO/World Bank Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction – HRP); 2021.
  11. Sholeh MA, Isrdji I, Oktavianti DP, Fatmawati D. Pengaruh ekstrak terung ungu (*Solanum melongena* L.) terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa secara in vitro. *Jurnal Wiyata Penelitian Sains & Kesehatan*. 2020;7(1):78-85. Doi: <http://dx.doi.org/10.56710/wiyata.v7i1.401>
  12. Arundani P, I'tishom R, Purwanto B. Pemberian ekstrak rumput kembar (*Biophytum petersianum* Klotsch) terhadap viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) diabetes melitus. *Oceana Biomedicina Journal*. 2021;4(1):26–37. Doi: <https://doi.org/10.30649/obj.v4i1.58>
  13. Rohmah L, Triana IN, Sunarso A, Susilowati S, Hidajati N, Kurnijasanti R. Pengaruh pemberian ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) dengan paparan suhu panas. *Ovozoa: Journal of Animal Reproduction*. 2018;7(2):131-6. Doi: <https://doi.org/10.20473/ovz.v7i2.2018.131-136>
  14. Molitoris BA, Sandoval RM, Yadav SPS, Wagner MC. Albumin uptake and processing by the proximal tubule: physiological, pathological, and therapeutic implications. *Physiol Rev*. 2022;102(4):1625–67. Doi: 10.1152/physrev.00014.2021
  15. Cheng Q, Li L, Jiang M, Liu B, Xian Y, Liu S, et al. Extend the survival of human sperm in vitro in non-freezing conditions: damage mechanisms, preservation technologies, and clinical applications. *Cells*. 2022;11(18):2845. Doi: 10.3390/cells11182845.
  16. Raad G, Mansour J, Ibrahim R, Azoury J, Azoury J, Mourad Y, et al. What are the effects of vitamin C on sperm functional properties during direct swim-up procedure? *Zygote*. 2019;27(02):69–77. Doi: 10.1017/S0967199419000030