

Pengaruh *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* Terhadap Kerusakan Membran Plasma Sperma Secara In Vitro

Oleh :

Sukarjati

Tenaga Pengajar Prodi Biologi FMIPA Universitas PGRI Adi Buma Surabaya

ABSTRAK

Pengaruh berbagai spesies bakteri dan ratio sperma/bakteri terhadap kerusakan membran plasma sperma telah diteliti. Empat spesies bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* yang diperoleh dari kultur semen pria infertil dan *E. coli* yang diperoleh dari kultur cairan prostat pada pria yang mengalami kegagalan prostat dan sistem urinarius. Dalam penelitian ini digunakan dua puluh sampel semen yang memenuhi kriteria WHO (1992). Setelah dipeparasi menggunakan metode Kolom Beningkat Percoll, sperma diinokulasi dengan *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* dan *E. coli* dalam mikrotiter dengan ratio sperma/bakteri 1:10 dan 1:1000. Kerusakan membran plasma sperma diukur menggunakan metode Hypoosmotic swelling (HOS) dan diamati segera, 3 jam dan 6 jam setelah inokulasi. Hasil studi menunjukkan bahwa *Staphylococcus epidermidis* dan *Streptococcus faecalis* tidak berpengaruh terhadap kerusakan membran plasma sperma. *Enterobacter aerogenes* berpengaruh terhadap kerusakan membran plasma sperma pada ratio 1:10 setelah 6 jam inkubasi. Pengaruh *E. coli* terhadap kerusakan membran plasma sperma terjadi pada ratio sperma/bakteri 1:10 setelah 3 dan 6 jam inkubasi serta pada ratio sperma/bakteri 1:1000 setelah 3 jam inkubasi.

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pengaruh negatif bakteri terhadap kerusakan membran plasma sperma secara *in vitro* tergantung pada spesies bakteri, konsentrasi bakteri dan lama inkubasi. Yang paling buruk pengaruhnya terhadap kerusakan membran plasma sperma adalah *E. coli* pada ratio sperma/bakteri 1:10 pada 6 jam inkubasi.

Kata kunci : *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* dan *E. coli*, Ratio Sperma/bakteri, kerusakan membran plasma, Hypoosmotic swelling (HOS) test.

A.

Infeksi traktus genitalis telah diakui sebagai penyebab infertilitas (Megory, 1987). Infeksi traktus genitalis tersebut meliputi prostatitis, epididimitis, vesikulitis dan orchitis. Infeksi traktus genitalis berperan dalam infertilitas pria, karena (a) secara langsung berpengaruh pada spermatozoa atau (b) secara tidak langsung menghasilkan obstruksi atau lesi non destructive pada duktus ekskretori, lesi pada kelenjar seks aksesori atau akhirnya menyebabkan timbulnya antibodi anti sperma (ASA) (Auroux et al, 1991).

Bakteri penyebab infeksi traktus genitalis pria dibagi menjadi bakteri patogen dan non patogen. *Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri patogen yang paling sering sebagai penyebab prostatitis dan epididimitis (Liu, 2002). Hasil survey yang peneliti lakukan di Klinik Infertilitas di Surabaya di dapat bahwa dari 1727 sampel

PENGANTAR

semen yang dikultur mulai tahun 1990 sampai dengan 1997, bakteri yang mencemari semen meliputi : *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus faecalis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas*, *Streptococcus pyogenic*.

Penelitian tentang pengaruh *E. coli* terhadap kualitas spermatozoa secara *in vitro* telah banyak dilakukan dengan hasil bahwa *E. coli* dapat menyebabkan menurunnya motilitas spermatozoa (Diemer, 1996; Huwe, 1998; Kohn, 1998), menyebabkan kerusakan membran plasma spermatozoa (Diemer, 1996). Sedangkan *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* yang juga sering ditemukan mencemari spermatozoa tetapi pengaruhnya terhadap spermatozoa secara *in vitro* belum banyak diteliti.

Menurut Michelman (1999) spesies bakteri yang berbeda dan jumlah bakteri yang berbeda menimbulkan spectrum patologis yang berbeda. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*,

B. MATERI DAN METODA

Sampel yang digunakan adalah pria yang mempunyai sperma normal menurut kriteria WHO, 1999, sejumlah 20 sampel.

Persiapan Bakteri

Spesies bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* yang diperoleh dengan mengkultur semen pria infertil, dan. El calf yang diperoleh dengan mengkultur cairan prostat pria penderita prostat dan gangguan saluran kencing. Identifikasi bakteri menggunakan standar kultur Bakteriologi. Masing-masing spesies bakteri yang bembur 24 jam di tanam pada Media earle's lalu dihomogenisasi dan dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mc Farland.(Standar Mc Farland terendah yang setara dengan bakteri sejumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/ ml) menggunakan Spektroskop. Apabila suspensi bakteri dalam media earle's sudah sesuai kekeruhannya dengan standar Mc Farland maka telah diperoleh bakteri dalam media earle's sejumlah $1,5 \times 10^8$ / ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran bakteri dengan media earle's 10 kali dan 1000 kali lebih rendah dan' konsentrasi spermatozoa hasil Percoll.

Persiapan Spermatozoa

Spermatozoa berasal dari ejakulat yang diperoleh dengan cam masturbasi setelah abstinensia sedikitnya 48 jam dan tidak lebih lama dari 7 hari. Kemudian dilakukan analisis sperma sesuai dengan kriteria WHO, 1999 yaitu : volume 2 ml atau lebih, pH 7,2-7,8, jumlah sperma/ml adalah 20 juta sperma/ml atau lebih. Jumlah sperma per ejakulat 40 juta/ ejakulat atau lebih. Motilitas sperma 50% atau lebih bergerak maju (kategori a+b) atau 25% atau lebih bergerak maju dengan cepat

C. HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

Pada uji pembengkakan hiposmotik, *Staphylococcus epidermidis* dan *Streptococcus faecalis* tidak berpengaruh terhadap kerusakan membran plasma sperma,

Enterobacter aerogenes dan *E.Coli* pada spermatozoa/bakteri yang berbeda dan waktu yang berbeda terhadap kerusakan membran plasma spermatozoa menggunakan metode *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS Test / uji bengkok hipo-osmotik).

(kategori a) dalam waktu 60 menit setelah ejakulasi. Morfologi 30% atau lebih bermorfologi normal. Vitalitas 70 % atau lebih hidup yaitu tidak terwarnai dengan pewarnaan supravital. Lekosit kurang dari satu juta / ml. Sperma yang telah memenuhi syarat sebagai sampel selanjutnya dilakukan pencucian sperma menggunakan metode kolom bertingkat Percoll. Spermatozoa hasil Percoll tersebut kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan Haemositometer Neuber.

Perlakuan Spermatozoa dengan Bakteri

Spermatozoa hasil Percoll di inokulasi dengan *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, dan *E. coli* dengan ratio spermatozoa/bakteri 1le, 1: 1000 dan tanpa bakteri (kontrol) pada mikroplate.

Pengamatan

Pengamatan kerusakan membran plasma spermatozoa menggunakan metode *Hypoosmotic Swelling Test* dilakukan pada 0 jam, 3 jam dan 6 jam. Adapun prosedur *Hypoosmotic Swelling Test* adalah sebagai berikut : 1 ml larutan pembengkak (terdiri dari 0,75 g sodium sitrat dan 1,351 fruktosa dalam 100 ml akuades) pada tabung eppendorf tertutup dihangatkan pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya ditambah 0,1 ml sperma yang telah diinkubasi dengan bakteri dan diaduk dengan pipet. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya diamati adanya pembengkakan pada bagian ekor sperma menggunakan mikroskop beda fase. Diamati pada 100 sperma.

Analisis statistik

Data yang terkumpul dianalisa dengan menggunakan anava faktorial sama subyek.

Pada *Enterobacter aerogenes* terjadi perbedaan kerusakan membran plasma sperma antara kontrol dan ratio 1 : 10 setelah 6 jam inkubasi. Sedangkan pada *E. coli* ten'adi perbedaan kerusakan membran plasma sperma antara

kontrol dengan ratio 1 : 10 serta ratio 1 : 1000 dengan 1 : 10 setelah 6 jam inkubasi.

Tabel 1 : Uji beda rerata. pengaruh spesies bakteri pada ratio spermatozoa/bakteri dan lama inkubasi yang berbeda terhadap kerusakan membran plasma sperma.

Spesies Bakteri	Lama Inkubasi	Ratio Sperma / Bakteri		
		Kontrol	1 : 1000	1 : 10
<i>S. epidermidis</i>	0	95,8	94,6	93,8
	3	92,4	92,8	91,4
	6	90,0	88,4	87,0
<i>S. faecalis</i>	0	95,8	96,4	94,6
	3	92,4	90,8	90,0
	6	90,0	87,4	85,8
<i>S. aerogenes</i>	0	95,8	94,0	96,0
	3	92,4	90,2	90,0
	6	90,0 ^a	87,6	93,8 ^a
<i>E. coli</i>	0	95,8	95,2	94,2
	3	92,4	91,8	87,6
	6	90,0 ^b	86,6 ^c	79,8 ^{bc}

Huruf yang sama pada baris sama menunjukkan perbedaan yang bermakna

D. PEMBAHASAN

Uji pembengkakan hipo-osmotik adalah uji yang didasarkan atas sifat semi permeabel membran sel yang utuh, yang memungkinkan sperma mengalami pembengkakan dibawah kondisi hiposmotik, jika ada influk air yang menyebabkan penambahan volume sel. Uji pembengkakan hiposmotik ini memberikan informasi tentang integritas dan kekuatan membran sel dari ekor spenna (WHO, 1999).

Spesies bakteri yang berbeda mempunyai pengamh yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa manusia secara in vitro. Hal ini dapat di jelaskan bahwa pada penelitian ini spesies bakteri yang digunakan sebagai penginfektir spermatozoa secara in vitro terdiri atas bakteri patogen dan non patogen. Yang tergolong patogen adalah *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* dan *E. coli*. Sedang yang non patogen adalah *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri patogen dan non patogen mempunyai kemampuan yang berbeda. Diantara spesies bakteri patogen. derajat patogenimsnya juga berbeda . Hal ini disebabkan toksigenitas, daya invasi serta adhesivitas dari setiap spesies bakteri tersebut berbeda-beda Spesies bakteri yang mempunyai derajat patogenitas yang berbeda ini apabila menginfeksi spermatozoa, maka menyebabkan pengaruh yang berbeda pula terhadap kualitas spermatozoa.

Bila dibandingkan dengan kontrol, *Staphylococcus epidermidis* tidak berpengaruh terhadap kerusakan membran plasma spermatozoa baik pada ratio spermatozoa/bakteri 1:10 maupun 1: 1000. *Staphylococcus epidermidis* tergolong bakteri coccus gram positif. Menurut Fowler (1983), bakteri aerob gram positif yang meliputi *Staphylococcus epidermidis*, diphtheroids, dan *Streptococcus* sering mengkolonisasi urethra pria tetapi tidak terlibat sebagai penyebab urethritis. Studi pada pria dengan epididimitis akut menunjukkan bahwa jarang bakteri gram positif sebagai agen penyebab.

Pada penelitian ini *Streptococcus faecalis* bila dibanding kontrol tidak berpengaruh terhadap kerusakan membran plasma spermatozoa baik pada ratio spermatozoa/bakteri 1:10 maupun 1: 1000. Spermatozoa yang mengalami kerusakan membran plasma sperma ini mengakibatkan penurunan motilitas sperma. Jacques et al (1990) telah mengamati bahwa tidak terjadi penamaan motilitas spermatozoa dalam studi in viva pada semen yang terkontaminasi dengan *Streptococcus faecalis*. Makler et al (1981) menyatakan bahwa *Streptococcus faecalis* pada konsentrasi tinggi tidak mengubah motilitas dan Viabilitas spermatozoa. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Huwe (1998) juga di dapatkan bahwa

strain *Enterococcus (Streptococcus faecalis)* tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa.

Enterobacter aerogenes bila dibanding kontrol berpengaruh terhadap kerusakan membran plasma sperma pada ratio spermatozoa/bakteri 1:10 setelah 6 jam inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa tampaknya *Enterobacter aerogenes* untuk dapat berpengaruh terhadap spermatozoa diperlukan dalam konsentrasi tinggi dan memerlukan waktu inkubasi yang lebih lama. Dari penelusuran kepustakaan yang ada, penelitian menggunakan *Enterobacter aerogenes* sebagai bakteri penginfeksi spermatozoa secara in vitro jarang dilakukan sehingga tidak diketahui peran *Enterobacter aerogenes* terhadap kualitas spermatozoa.

Pengaruh *E. coli* terhadap kerusakan membran plasma sperma terjadi pada ratio sperma/bakteri 1:10 setelah 6 jam inkubasi. Dari hasil penelitian Gopalkrishnan (1994) di dapatkan bahwa terjadi perbedaan yang signifikan terhadap kerusakan membran plasma sperma antara sampel pria yang positif terinfeksi bakteri gram negatif.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Kohn et al (1998) yang mengkontaminasi spermatozoa dengan 2.10^6 *E. coli/ml* di dapat hasil terjadi penurunan motilitas secara bermalam setelah 3 jam inkubasi. Sedangkan Auroux (1991) berpendapat bahwa konsentrasi *E. coli* 10^4 /ml tidak menurunkan motilitas spermatozoa. Dari hasil Benelitiannya didapat bahwa motilitas populasi 10^7 spermatozoa/ml berkurang secara signifikan dengan adanya 10^6 /ml *E. coli* bila dibanding spermatozoa yang berjumlah 4.10^7 /ml.

Faktor-faktor dari *E. coli* yang dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa telah banyak diteliti. Dari hasil penelitian yang dilakukan Auroux et al (1991) didapat bahwa endotoksin *E. coli* tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa. Telah dipercaya bahwa adanya perlekatan bakteri ke spermatozoa yang menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa (Wolff, 1993). Adanya perlekatan ini mengakibatkan terjadinya aglutinasi (Wolff, 1993) dan mengakibatkan kerusakan membran plasma spermatozoa (Diemer, 1996). Interaksi spermatozoa *E. coli* terjadi 2 tahap yaitu adhesi lalu destruksi membran spermatozoa. Adanya kerusakan membran bedakan dengan pergerakan

spermatozoa. Dengan adanya perlekatan *E. coli* pada membran spermatozoa menyebabkan kerusakan membran spermatozoa, sehingga akan menimbulkan gangguan transpor zat yang dibutuhkan sebagai sumber energi untuk pergerakan spermatozoa.

Selain spesies bakteri, ratio spermatozoa/bakteri juga berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa. Pengaruh ratio spermatozoa/bakteri terhadap kualitas sperma dapat dijelaskan sebagai berikut: Pada prinsipnya bakteri berpengaruh terhadap spermatozoa hanya ketika bakteri tersebut mengadakan kontak dengan spermatozoa (Auroux, 1991). Penurunan kualitas sperma terjadi jika jumlah bakteri banyak dan jumlah spermatozoa sedikit. Hal ini bisa dijelaskan bahwa semakin tinggi ratio spermatozoa/bakteri maka kesempatan kontak bakteri dengan spermatozoa semakin besar, bila ratio spermatozoa/bakteri rendah maka bakteri jarang mempunyai kesempatan kontak dengan spermatozoa.

E. SIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tampaknya pengaruh negatif bakteri terhadap kerusakan membran plasma spermatozoa secara in vitro tergantung pada strain bakteri yang digunakan sebagai penginfeksi spermatozoa, konsentrasi bakteri serta lama inkubasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Auroux MR., Jacquat... Mathieu D., and Auer I., (1991) : *Is (he Sperm Bacterial Ratio a Determining Factor in Impairment of Sperm Motility : An In vitro Study in Man With Escherichia coli*. Int. of Andrology, 14 : 264-270.
- Diemer T, Weidner W., Michelmann HW., Schiefer HG., Rovani E., and Mayer F., (1996): *Influence of Escherichia coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro*, Int J of Andrology, 19 : 271-277
- Fowler JE., Kaler R., (1983) : Genital Tract Infection , In : Lipschutz u., Haward SS. (Ed), *Infection in The Male* , New York : Churchill Livingstone. 187-206.
- Gopalkrishnan. K., Joseph. R., Sheth A., (1994) : *Alteration of Semen Characteristics and Regulatory Factor in Human Semen With Bacterial*

- Infection*. Arch.of Andrology ,32 : 213-218.
- Huwe P., Dicmer T., Ludwig M.m Lui J., Schiefer Hg, Weidner W., (1998), *Influence of Dm'eren: Urophatogem'c microorganism on human sperm motility parameter in an in vitro experiment*. Andmlogia, 30 Supp 1 : 55-59
- Jacques L, Mathieu D., Auer J., & Auroux M., (1990): *Effect of Urogenital infection on Sperm parameters and hypofertility in men*, Biomedicine and Phan'naco Therapy, 44: 225-228
- Kohn. FM.. Erdmann, l. Oeda T., Mulia, KF., Schiefer, HG., and Schill WB.,(1998) : *Influence of Urogenital inferction on Sperm Function* , Andrologia,30 Supp 1 : 73-80
- Liu, jh., Li HY.. Cao SG., Duan YE, Li Y., 2002, *Influence of several umphatogcnic microorgaan on human sperm motility in vitro*. Asian J. Androl, 4: 179182.
- Michclmann HW... 1998. Influence of bacteria and leucocyte on the outcome in vitrofertilization (IVF) or Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), Andmlogia, 30(1):99-101.
- Makler A., Urbach Y., Lefler DS., Merzbach D., (1981) : *Factors efecting Sperm Motility. VI. Sperm Viability under the Influence of Bacterial Growth In Human Ejaculate*, Fenil Steril 35 : 666-670
- Megory E., Zuckermann, H., Shabum, Z., Lunenfeld, B., (1987) : *Irfection and Male Fertility USA : Obstetrical and Gynecological Survey*, Vol 42, No : 5, 283-290.
- Wolff,H., Panhans, A., Stolz,W., Maurer, M., (1993) : *Adherence of Escherichia coli to Sperm : A manose mediated phenomenon leading to aglutination of Sperm and Escherichia coli* , Fertility Sterility 60 1154-158.