

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Spermatogenesis

Proses pembentukan dan pematangan spermatozoa dimulai dengan pertumbuhan spermatogonium menjadi sel spermatosit primer. Sel – sel ini membelah secara mitosis menjadi dua spermatosit sekunder yang sama besar, kemudian mengalami pembelahan meiosis menjadi empat spermatid yang sama besar. Spermatid adalah sebuah sel bundar dengan sejumlah protoplasma dan merupakan gamet dewasa dengan sejumlah kromosom haploid. Proses spermatogenesis sangat tergantung pada hormonal tubuh. Proses ini berlangsung dalam testis dan lamanya sekitar 65 sampai 72 hari dan terjadi bersamaan pada waktu yang berbeda di berbagai wilayah testis untuk produksi dan ketersediaan sperma dewasa (Irina Szmelskyj, 2015).

Produksi sperma adalah proses yang terus menerus, dimulai pada masa pubertas dan berlanjut sepanjang hidup yang terjadi di tubulus seminiferus. Spermatozoa dilepaskan dari tubulus seminiferus ke dalam epididimis mengalami pematangan pasca testicular. Sebelum pembuahan terjadi, spermatozoa harus menjalani perubahan biokimia lebih lanjut melalui reaksi kapasitif dan akrosom. Metode Pengukuran secara langsung spermatogenesis kinetika *in vivo* menunjukkan bahwa keseluruhan proses produksi sperma lebih pendek dari yang diperkirakan sebelumnya. Metode kinetika *in vivo* dapat mengkarakterisasi

hubungan antara spermatogenesis dan kualitas semen pada infertilitas pria, termasuk pengukuran efek paparan gonadotoksik serta intervensi medis dan bedah (Sandro c. Esteves, Ricardo Miyaoska, 2015).

Proses pembentukan spermatozoa dipengaruhi oleh kerja beberapa hormon sebagai berikut:

a. *Testosteron*

Hormon Testosteron bertanggung jawab terhadap pertumbuhan seks sekunder pria seperti pertumbuhan kumis dan jenggot, penambahan masa otot dan perubahan suara. Hormon testosteron di produksi di testis, yaitu sel leydig yang berperan penting bagi tahap pembelahan sel – sel germinal untuk membentuk sperma dan berfungsi merangsang perkembangan organ seks primer serta mendorong spermatogenesis.

b. *Luteinizing Hormon/ LH*

Luteinizing Hormon dihasilkan oleh kelenjar hipofisis anterior. Fungsi LH adalah merangsang sel leydig untuk menghasilkan hormon testosteron pada masa pubertas antara usia 13 sampai 15 tahun, yang berdampak pada peningkatan tinggi dan berat badan serta penambahan panjang penis dan testis.

c. *Follicle Stimulating Hormone/ FSH*

Follicle Stimulating Hormone dihasilkan oleh kelenjar hipofisis anterior. FSH berfungsi merangsang sel sertoli menghasilkan ABP (*Androgen Binding Protein*) yang akan memacu spermatogonium untuk memulai proses spermatogenesis. Proses pematangan spermatosit menjadi spermatozoa disebut

spermiogenesis. Spermiogenesis terjadi di dalam epididimis dan membutuhkan waktu selama 2 hari.

d. *Estrogen*

Estrogen *dibentuk* oleh sel – sel sertoli ketika distimulasi oleh FSH. Sel-sel sertoli juga mensekresi suatu protein pengikat androgen yang mengikat testosteron dan estrogen serta membawa keduanya ke dalam cairan pada tubulus seminiferus.

e. Hormon Pertumbuhan

Hormon pertumbuhan diperlukan untuk mengatur metabolisme testis. Hormon pertumbuhan secara khusus meningkatkan pembelahan awal pada spermatogenesis.

f. Hormon Gonadotropin

Hormon gonadotropin dihasilkan oleh hipotalamus. Hormon gonadotropin berfungsi untuk merangsang kelenjar hipofisa bagian depan (anterior) agar dapat mengeluarkan hormon FSH dan LH.

1.2 Semen dan Plasma semen

Semen atau ejakulat disebut juga mani, cairan putih, air mani, atau pejuh adalah cairan yang membawa sel-sel sperma yang dikeluarkan oleh organ seksual jantan. Fungsi utama semen adalah untuk mengantarkan sel-sel sperma untuk membuahi sel telur yang dihasilkan oleh individu betina. Cairan semen yang utama terdiri dari cairan vesica seminalis (60%). Cairan pertama kali yang keluar dari ejakulat adalah kelenjar *bulbourethalis* dimana cairan ini mensekresikan

larutan yang bersifat alkali bersama glycoprotein untuk melumasi serta membersihkan saluran sperma ketika keluar dari ductus ejakulatorius dan uretra, cairan kedua adalah cairan dari epididimis, ductus deferent berkontraksi bersama mengeluarkan spermatozoa dan cairan prostat. Enzim pembekuan dari cairan prostat menyebabkan fibrinogen cairan vesika seminalis membentuk koagulum yang lemah, yang kemudian larut dalam 15-20 menit berikutnya karena lisis oleh fibrinogen yang dibentuk dari profibrinogen prostat. Seorang laki-laki dapat mengeluarkan 300 – 400 juta sel spermatozoa pada saat ejakulasi (Henkel *et al.*, 2007).

Plasma seminal merupakan campuran sekresi dari epididimis yang berguna mensekresikan *Glycerylphosphorylcholine* (GPC). Plasma seminal terdiri dari berbagai komponen biokimia seperti glukosa, kolesterol, protein, metabolit, enzim intraseluler, antioksidan dan unsur mineral yang penting untuk fungsi sperma serta metabolisme. Plasma seminal tidak hanya mengangkut spermatozoa tetapi juga memberikan perlindungan dan nutrisi pada spermatozoa selama pergerakan selanjutnya ke saluran reproduksi wanita. Komponen biokimia dan enzim pada plasma seminal berfungsi sebagai penanda biologis untuk kualitas mani dalam fungsi sperma, integritas dan kerusakan. Korelasi positif antara parameter mani dan beberapa nilai biokimia seperti glukosa, Ca, ALP dan LDH memainkan peran kunci dalam kapasitas dan pergerakan spermatozoa ke depan (Rao Talluri, Gorak Mal & Sanjay Kumar Ravi, 2017).

1.3 Analisis Semen

Analisis semen merupakan satu langkah pemeriksaan pertama yang dilakukan untuk mengetahui apakah seorang pria memiliki masalah kesuburan (infertilitas). Analisis semen mencakup evaluasi dari parameter makroskopis dan mikroskopis (Keel, 2006). Analisis semen adalah prosedur standar untuk mengukur semen dan parameter berbagai sperma meskipun masih banyak faktor yang berpengaruh terhadap potensi kesuburan diantaranya adalah pH ejakulat, viskositas, warna dan bau. Konsentrasi sperma, motilitas dan morfologi umumnya dianggap tiga yang paling penting dalam parameter pemeriksaan masalah infertilitas. Parameter ini terbukti sangat berguna dalam diagnosis masalah kesuburan antara pasangan serta prediksi suksesnya ART, *Assisted Reproductive Technology* (ART) adalah analisis sperma (Henkel et al., 2007, van der Horst et al., 2009).

1.4 Makroskopis Semen

Pemeriksaan makroskopis semen merupakan pemeriksaan awal melalui pengamatan fisik sampel. Pengamatan dilakukan pada suhu kamar, dimana penilaian pada volume, bau, likuefaksi, warna, konsistensi dan Ph.

1. Volume Sperma

Volume semen ditampung dengan gelas ukur atau pipet khusus. Jika diperlukan pemeriksaan *Bio-assay* atau kultur semen, maka semua peralatan harus steril. Tabung plastik dan jarum *hipodermik* tidak boleh digunakan karena dapat

mempengaruhi motilitas spermatozoa. Volume normal lebih dari 2 ml dari ejakulasi merupakan indikator akurat dari berbagai kelainan, tidak adanya volume ejakulat setelah orgasme, diistilahkan aspermia dimana kemungkinan terjadi pada pasien dengan neuropati diabetes, mengkonsumsi obat *simpatolitik* dan pernah mengalami prosedur bedah yang merusak reseksi prostat. Hipospermia bila volume ejakulat kurang dari 0,5 ml. Jika hipospermia dikaitkan dengan pH lebih dari 7,4 ml mengindikasikan penurunan fungsi kelenjar aksesori seperti dalam kasus *hipogonadisme*, peradangan atau asupan narkotika. *Hiperspermia* bila volume ejakulat lebih dari 6 ml. Faktor-faktor yang mempengaruhi volume semen antara lain *abstinensia*, keadaan emosi atau rangsangan pada saat terjadinya ejakulasi.

2. Bau Sperma

Spermatozoa mempunyai bau khas, seperti bunga akasia. Semen dapat berbau lain seperti amis, busuk dapat dicurigai adanya leukosit (infeksi) atau sebab sebab lain seperti parasit.

3. Koagulasi dan likuefaksi

Semen ejakulat akan mengalami proses koagulasi (terbentuknya koagulum) yang disebabkan oleh protein-protein yang dihasilkan oleh kelenjar vesika seminalis. Semen normal pada suhu ruang akan mengalami pencairan (likuefaksi), menjadi homogen dalam waktu 60 menit. Pada sampel sperma yang tidak mengalami likuefaksi maka dapat ditambahkan bromerelin atau plasmin agar sampel semen dapat segera mengalami pencairan dengan segera. Proses

penambahan bahan-bahan tersebut belum diketahui dengan jelas apakah mempengaruhi fungsi spermatozoa atau biokimia plasma semen.

4. Warna Sperma

Warna spermatozoa normal adalah putih keabuan atau putih mutiara agak keruh. Pada keadaan *Azoospermia* atau *Oligospermia* sperma akan berwarna putih jernih, warna putih, jernih inilah yang sering ditafsirkan sebagai mani encer. Apabila didapatkan sel eritrosit maka sperma akan berwarna kecoklatan atau merah tua, hal ini disebabkan hemoglobin dalam kasus hemospermia.

5. Konsistensi atau Viskositas

Konsistensi atau viskositas dapat diukur dengan menekan keluar sampel lewat jarum 21G. Observasi bentuk yang keluar berupa tetesan atau bentuk seperti benang yang keluar dari ujung jarum. Nilai normal apabila yang keluar berupa tetesan. Nilai abnormal apabila berupa benang dengan panjang lebih dari 2 cm. Pengukuran dapat dilakukan juga dengan pipet *Eliasson* yang disederhanakan skalanya. Pengukuran dilakukan dengan cara semen dihisap sampai tanda 0,1 ml, ujung atas ditutup dengan jari telunjuk dan dipegang tegak lurus. Tangan kiri memegang *stopwatch*. Bersamaan dibukanya tutup ujung jari, *stopwatch* ditekan. Hitung waktu jatuhnya tetesan pertama, normal 2 detik. Cara yang lain dengan batang pengaduk gelas, celupkan batang pengaduk ke dalam semen, angkat dan perhatikan tetesan/benang cairan yang terjadi. Normal apabila tetesan/benang tidak melebihi 2 cm.

6. pH Sperma

Pengukuran dilakukan dengan kertas pH atau lakmus. pH harus diperiksa dalam waktu 1 jam setelah ejakulat. Semen yang terlalu lama akan berubah pH nya. Nilai normal lebih dari 7.2-8.0 sesuai standart WHO 92 :7.2-8.0. pH lebih tinggi dari 8.0 patut dicurigai adanya infeksi akut kelenjar prostat. Ph dibawah 7.2 dengan *Azoospermia* kemungkinan terjadi infeksi pada vesika seminalis atau epididymis.

6.5 Mikroskopis Semen

Pemeriksaan mikroskopis semen meliputi konsentrasi sperma, motilitas, aglutinasi, viabilitas sperma, morfologi. Hasil kesimpulan analisis semen banyak ditentukan dari pemeriksaan mikroskopis semen.

1. Konsentrasi sperma

Syarat utama dalam pemeriksaan konsentrasi spermatozoa adalah jumlah spermatozoa per lapang pandang harus homogen, tersebar merata. Apabila jumlah per lapang pandang sangat bervariasi menandakan sampel tidak homogen. Pemeriksaan harus diulang, semen harus dicampur dengan baik agar sampel benar-benar homogen. Konsentrasi dapat dipelajari dengan cara satu tetes semen diteteskan pada kaca obyek, tutup dengan kaca penutup dan dilihat dibawah mikroskop (400X).jika kita sulit memperkirakan jumlah atau kepadatan spermatozoa per lapang pandang yang bergerak maka kita panaskan obyek glass dengan cara dilewatkan diatas api bunsen hingga spermatozoa akan mati. Lihat di bawah mikroskop dan kita sekarang akan lebih mudah menghitung dengan *counter* jumlah spermatozoa yang tidak bergerak.

Konsentrasi sperma ditentukan dengan menggunakan hemositometer. Sampel harus tercampur rata sebelum melakukan perhitungan, sampel sperma perlu dilakukan pengenceran misalnya sampel dengan perkiraan $20 \cdot 10^6$ /ml, dapat diencerkan 1/20 dengan pipet leukosit dan jika perkiraan $>100 \cdot 10^6$ /ml dapat diencerkan 1/100 dengan pipet eritrosit. Larutan pengencer menggunakan 50 g NaHCO_3 , 10 ml formalin 35%, 5 ml cairan gentian violet jenuh dan air sampai 1000 ml. Perhitungan dengan *Neubauer Improve* sama dengan perhitungan leukosit atau eritrosit, dihitung hanya spermatozoa saja yaitu kepala dan ekor, perhitungan dilakukan pada bidang tengah yang terdiri dari 25 bidang besar yang didalamnya berisi 16 bidang kecil. Dihitung 25 bidang besar apabila didapatkan <10 ekor per bidang, 10 bidang apabila didapatkan 10 – 40 ekor per bidang dan 5 bidang apabila >40 spermatozoa per bidang, sebaiknya dihitung kedua bidang besar dan nilai akhir yaitu nilai rata-rata nya. Konsentrasi adalah jumlah spermatozoa per ml semen dengan nilai normal 20 juta/ml sedangkan jumlah spermatozoa total adalah jumlah sperma dalam ejakulat yaitu konsentrasi sperma dikalikan dengan volume.

2. Motilitas

Motilitas sperma adalah kemampuan sperma dalam bergerak dengan tepat menuju sel telur. Sperma yang tidak bergerak dengan baik tidak akan mampu mencapai sel telur dalam proses fertilisasi. Penilaian motilitas dapat dilakukan dengan cara satu tetes semen (10-15 μL) diteteskan dengan mikro pipet pada kaca obyek dan ditutup dengan kaca penutup kemudian preparat diperiksa dibawah

mikroskop pada pembesaran 400X dengan beberapa lapang pandang (4-6 LPB). Berat dari kaca penutup akan menyebabkan tersebarnya sampel secara merata untuk memberikan pengamatan yang optimal. Preparat basah ini dibiarkan selama 1 menit pada suhu kamar (18-24°C), diluar suhu ini sperma akan terjadi motilitas. Pergerakan spermatozoa dapat diklasifikasikan dalam 4 golongan yaitu:

- a. Gerak spermatozoa cepat, maju kedepan dan lurus.
- b. Gerak spermatozoa maju, lambat atau berkelok.
- c. Tidak ada gerak maju ke depan.
- d. Tidak bergerak sama sekali.

Semen yang normal menunjukkan 60% spermatozoa motil atau lebih yang sebagian besar menunjukkan pergerakan baik sampai sangat baik.

3. Aglutinasi

Aglutinasi sperma terjadi karena spermatozoa yang motil terikat satu dengan yang lain. Ikatan ini terjadi antara kepala dengan kepala, leher dengan leher, ekor dengan ekor ataupun tipe campuran antara kepala dengan ekor dan lain-lain. Aglutinasi sperma mengarah pada proses imunologis sebagai penyebab infertilitas.

Aglutinasi diamati pada 10 lapang pandang secara acak dan tentukan presentase rata-rata sperma yang berlekatan.

4. Viabilitas sperma

Viabilitas sperma harus dinilai jika persentase sperma motil progresif rendah sekitar 30 – 40%. Tingkat normal seorang pria dikatakan subur akan menghasilkan sekitar 58%-60% sperma hidup. Pemeriksaan viabilitas sperma

penting untuk menentukan apakah spermatozoa non motil tersebut hidup atau mati. Metode yang dilakukan biasanya dengan cara pengecualian *dye* mana *dye* memasuki non vital (mati) sel karena membran plasma yang rusak, metode pewarnaan yang umum digunakan adalah eosin-nigrosin. Keuntungan untuk noda ini adalah slide permanen dapat dibuat dan nigrosin menunjukkan latar belakang gelap untuk penilaian sel-sel sperma yang layak. Sperma yang tidak layak memiliki kepala warna merah atau merah gelap dan sperma layak memiliki kepala putih atau merah muda yang samar, sebagai acuan sel-sel yang layak tidak akan muncul bernoda dan sebaliknya sel non layak akan mengambil noda. Viabilitas sperma dan kemampuan fertilisasi sperma memiliki korelasi positif dalam keberhasilan reproduksi (silva & gadella, 2006).

5. Morfologi sperma

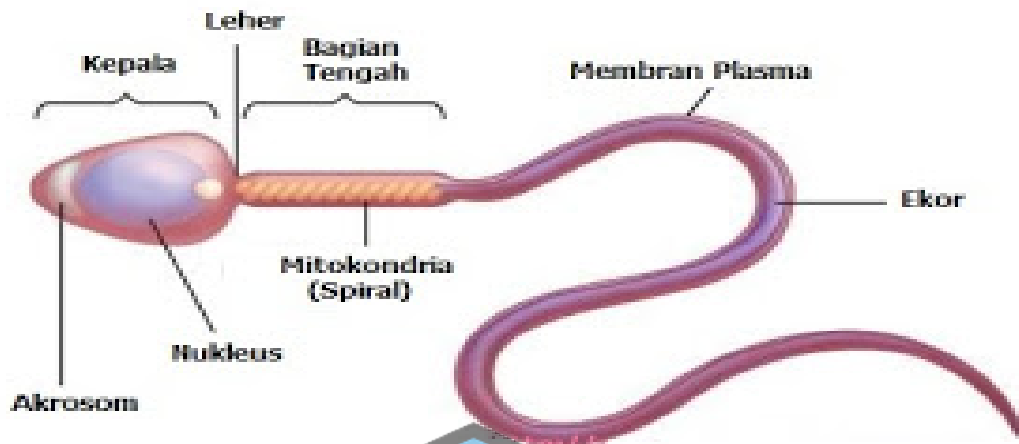
Morfologi sperma adalah keseluruhan bentuk sperma yang telah dilakukan proses pengecatan dan bentuk normalnya didasarkan pada kriteria kruger. Proses ini bertujuan untuk melihat bentuk-bentuk sperma dan menentukan persentase bentuk abnormal dari kepala sampai ekor. Pemeriksaan morfologi memerlukan persiapan khusus dengan membuat hapusan ejakulat pada *objek glass*, difiksasi dan diwarnai sehingga bentuk sperma dapat dinilai. Evaluasi dapat menunjukkan kemampuan sperma dalam proses pembuahan, dimana *akrosom* melepaskan *enzim hidrolitik* dan membantu sperma melalui lapisan luar (Mehta et al., 2006).

Pemeriksaan morfologi perlu memperhatikan bentuk dan ukuran atau besarnya. Penilaian dilakukan dari ujung kepala sampai ujung ekor. Kriteria

morfologi sperma yang ditetapkan oleh kruger mendefinisikan spermatozoa normal memiliki konfigurasi oval dengan kontur halus. Kepala oval dengan panjang 4-5 μm , diameter lebar adalah 2,5-3,5 μm diukur dengan mikrometer okuler bagian mid peace tipis dan lebar kurang dari 1 μm dengan panjang 1,5 x panjang kepala, jika ada tetesan sitoplasma tidak boleh melebihi setengah dari lebar kepala, semua bentuk yang meragukan dianggap abnormal.



Gambar 1. Morfologi spermatozoa (Hallo Sehat , 2016)



Gambar 2. Spermatozoa (RizkiNisfi's blog)

Struktur spermatozoa normal dan kelainannya mempunyai gambaran sebagai berikut:

1. Kepala

Bentuk oval atau bulat telur dengan ukuran panjang x lebar : $5 \times 3 \mu\text{m}$ dan lebarnya $2,5 - 3,5 \mu\text{m}$ (Batasan WHO). Panjang kepala $> 5\mu\text{m}$ dimasukkan kedalam bentuk makro jika $< 5\mu\text{m}$ dimasukkan kedalam bentuk mikro, sedangkan jika lebar kepala $> 3\mu\text{m}$ dimasukkan kedalam bentuk makro (gemuk). Rasio panjang : lebar = $1,50 : 1,75$.

Kepala spermatozoa bentuknya bervariasi. Isinya adalah inti yang didalamnya terkandung material genetik, haploid yang berisi kantong berisi sekresi-sekresi *enzim hidrolitik*. Spermatozoa yang kontak dengan telur, isi akrosomnya dikeluarkan secara *eksositosis* yang disebut dengan reaksi *akrosom* (Sistina, 2000).

Daerah akrosom merupakan daerah diujung kepala yang berwarna jernih, tidak mengandung organela-organela dan meliputi sekitar 40 – 70 % dari luas kepala, berbatas tegas dengan bagian belakang akrosom berupa garis lengkung sesuai dengan permukaan ujung kepala. Kelainan pada akrosom meliputi ukuran yaitu lebih kecil <40 %, bentuknya tidak teratur, mengandung kromatin, vakuola, bersepta. Kondensasi kromatin biasanya terletak di daerah belakang akrosom, merupakan daerah yang berwarna lebih gelap dan tampak homogen. Kelainan yang terjadi dapat berupa kelompok butir – butir kromatin atau benang- benang kromosom yang tersebar ataupun mengelompok disatu atau beberapa tempat di kepala.

2. Leher

Leher merupakan bagian yang menghubungkan kepala dengan ekor spermatozoa. Leher terdiri dari susunan lipid, kalium, kalsium, besi, Cu, fosfat dan *sulphidril* serta disulfida dan kolesterol. Leher mempunyai ukuran terpendek atau sempit, yaitu dengan panjang 1 – 2 μm lanjutan dari kepala, termasuk basis flagelum, cekungan inti, keping penghubung dengan *sentriol proksimal* dan *distal* (badan basal *flagelum*). Bagian leher yang sangat pendek ini maka kelainan yang terjadi disatukan dengan kelainan di *midpiece*.

3. Ekor

Panjang ekor 9 sampai 10 kali panjang kepala dengan bentuk lurus memanjang dari kepala atau membentuk alur gelombang. Ekor dapat dibagi menjadi 3 bagian yaitu *middle piece* yang berdekatan dengan leher, panjang 10 μm

mengelilingi sepasang tubulus central. Pada keadaan normal, leher dan *midpiece* berada dalam satu sumbu dengan sumbu panjang kepala. *Principal piece* yaitu bagian utama dengan panjang 40 – 45 μm , merupakan bagian yang terpanjang dengan serabut *fibrus*. *End piece* yaitu bagian terminal dengan panjang sekitar 2 - 5 μm , pada bagian ujung sudah tidak ada lagi serabut *vibrus* dan susunannya seperti silia biasa. Kelainan pada ekor dapat berupa kelainan dalam struktur, jumlah dan gangguan dalam perkembangannya. Kelaianan itu terjadi di *midpiece*, *principal piece* dan *end piece*. Kelainan pada ekor dapat berupa :



- a. Kelainan dalam ukuran panjangnya $< 40 \mu\text{m}$.
 - b. Kelainan bentuknya, tidak lurus atau membentuk gelombang tetapi bisa berbentuk ekor bengkok, ekor putus terpisah menjadi dua atau lebih, hal ini bisa terjadi dari leher sampai ujung ekor.
 - c. Kelaianan dalam jumlah ekor lebih dari satu dan biasanya disertai dengan kelainan kepala.
 - d. Kelaianan pertumbuhan dan perkembangan ekor belum sempurna tumbuh dan berkembang menjadi ekor yang lurus dan panjang, biasanya masih terikat dengan sitoplasma.
4. Butir Sitoplasma

Penilaian adanya butir sitoplasma menandakan adanya gangguan dalam proses pematangan atau pendewasaan *spermatozoon*. Letak butir sitoplasma atau badan sitoplasma bisa terjadi dikepala, *midpiece* maupun sepanjang ekor. Walaupun morfologi normal tetapi jika didapatkan butir sitoplasma maka dimasukkan dalam kelompok abnormal karena dianggap *immatur*.

Bentuk sperma abnormal menurut jauhari (2005):

1. Makro : Ukuran kepalanya lebih besar dari ukuran kepala normal.
2. Mikro : Ukuran kepalanya lebih kecil dari ukuran kepala normal.
3. Taper : Sperma kurus, lebar kepalanya setengah dari kepala normal dan tidak jelas batas *akrosom*.
4. Piri : Tidak jelas adanya kepala, hanya tampak *midpiece* dan ekor.
5. Amorf : Bentuk kepala ganjil, tidak jelas batas *akrosom*.
6. Round : Bentuk kepala seperti lingkaran, tidak terdapat *akrosom*.
7. *Cytoplasmic droplet* : menempel pada kepala dan warna lebih cerah.
8. Ekor abnormal : ekornya pendek atau spiral dan permukaan tidak halus atau ganda.

8.6 Evaluasi morfologi spermatozoa

Morfologi yang terlihat dimikroskop setelah dilakukan pengecatan bukan morfologi dari sperma hidup, tetapi gambaran bentuk setelah dilakukan pengecatan. Bentuk yang terlihat tergantung beberapa faktor seperti transport sperma, pematangan, aging, lamanya pada plasma semen, fiksasi dan kualitas pewarnaan. Bentuk spermatozoa pada pewarnaan akan tampak sedikit lebih kecil

dari pada bentuk spermatozoa hidup di semen tanpa pewarnaan, sehingga memerlukan kriteria yang ketat harus di terapkan ketika menilai morfologi normal dari spermatozoa, kepala harus oval. Fiksasi dan ketika dilakukan pewarnaan akan sedikit mempengaruhi bentuk aslinya. Pemeriksaan dalam menentukan morfologi dilakukan dengan mikroskop perbesaran 100 X lensa obyektif dan 10x lensa okuler dengan minyak imersi dengan tujuan terlihat lebih terang. Evaluasi dilakukan di beberapa daerah yang dipilih secara sistematis, semua spermatozoa normal dinilai dan spermatozoa abnormal dicatat, Estimasi panjang dan lebar dari spermatozoa dapat diukur dengan mikrometer okular (WHO, 1999).

8.7 Pengecatan Spermatozoa

a. Giemsa

Analisa sperma dengan pewarnaan giemsa (Romannovski-Giemsa) umumnya digunakan untuk study dan pemeriksaan infertilitas pada pria, giemsa adalah suatu teknik metode pewarnaan untuk pemeriksaan mikroskopik, nama giemsa diambil dari seorang peneliti malaria yaitu gustav giemsa, namun seiring perkembangan teknologi metode pewarnaan giemsa digunakan untuk pengecatan spermatozoa. Zat warna giemsa terdiri dari campuran eosin, *methylene blue*, dan *methylene azure*. Campuran zat tersebut akan membentuk eosinat yang membuat hasil pewarnaan menjadi lebih stabil. Zat ini tersedia dalam bentuk serbuk atau larutan yang disimpan didalam botol yang gelap (Kurniawan. 2010). Giemsa dapat diencerkan dengan *buffer* atau aquadest yang bertujuan untuk mempertahankan keadaan pH, idealnya pengencer giemsa mempunyai derajat keasaman 6,8 – 7,2

agar tidak berpengaruh pada pewarnaan morfologi. Giemsa adalah pewarnaan yang mudah dikerjakan dan sederhana untuk pemeriksaan rutin morfologi spermatozoa, pewarna giemsa lebih baik untuk evaluasi leukosit, detail sitoplasma, deferensiasi sel sel muda dan melihat sel – sel lain seperti *kristal fosfat*, butir lemak dan sel germinal terutama pada kasus *azoospermia*. Hal ini berguna sebagai pemeriksaan pendahuluan untuk membedakan kasus kegagalan testis dengan *obstruksi epididimis*. Harga yang murah dan mudah didapatkan menjadi faktor banyaknya penggunaan pewarnaan ini. Giemsa cukup akurat dan sederhana untuk pemeriksaan morfologi (Arsyad, 2011). Pewarnaan giemsa membutuhkan sekitar 20 kali pengenceran, pewarnaan cat sekitar 20 – 30 menit dengan pembilasan *buffer fosfat*. Waktu yang lama yaitu sekitar 30 menit menjadi kekurangan pada pewarnaan giemsa.

b. Hematoksilin dan Eosin

Hematoksilin Eosin adalah metode pewarnaan yang banyak digunakan dalam pewarnaan jaringan sehingga diperlukan dalam diagnosa medis dan penelitian. Hematoksilin adalah bahan pewarna yang sering digunakan pada pewarnaan histoteknik, merupakan ekstrak dari pohon yang diberi nama logwood tree. Hematoksilin bekerja sebagai pewarna basa, artinya zat ini mewarnai unsur basofilik jaringan. Hematoksilin memulas inti dan struktur asam lainya dari sel

menjadi biru. Eosin adalah zat warna merah fluorescent yang dihasilkan dari aksi brom pada fluorescent, zat ini bersifat asam yang akan memulas komponen asidofilik jaringan seperti mitokondria, granula sekretoris dan kolagen. Eosin mewarnai sitoplasma dan kolagen menjadi warna merah muda (junquera, 2007).

Hasil pewarnaan didapatkan berbagai variasi dan bentuk spermatozoa serta mempunyai kemampuan deferensiasi sendiri dalam membedakan warna *sitoplasma* dan *nucleus*. Pewarnaan hanya membutuhkan waktu 5 sampai 15 menit dengan fiksasi metanol dan pembilasan cukup dengan air mengalir. Harga yang mahal dan cat sulit dibersihkan menjadi salah satu Kekurangandari pewarnaan ini. Komerisial sampel yang bervariasi dari kelompok ke kelompok, tidak spesifik mewarnai inti dan sitoplasma protein, menyebabkan polusi (Hematin, reagen aktif dalam larutan hematoksilin di oksidasi menjadi oksihematin) dan gabungan hematoksilin dan metal sulit untuk dikontrol. pada kajian hematoksilin telah dibuktikan mahal dan dapat merusak lingkungan (Sigh,K, 2002).



b.8. Kerangka Teori

1. Kerangka Teori

Morfologi

Pra Analitik

Analitik

Pasca Analitik

- Persiapan & perlakuan sperma sebelum pemeriksaan
- Cara & waktu penampungan sampel sperma

- Sperma
- Cat Giemsa
- Cat Hematoksilin Eosin

Interpretasi Hasil

