

## Evaluasi Kromatin Sperma Sebagai Indikator Kualitas Sperma

Ahmad Syauqy

Kekhususan Biologi Kedokteran, FK Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

Email : asqybi30@gmail.com

### Abstrak

Ditemukannya kasus infertilitas pada pria yang tidak dapat dijelaskan mendorong para klinisi dan peneliti untuk menemukan pemeriksaan penunjang selain pemeriksaan fertilitas pria yang telah umum dilakukan. Saat ini, aspek kromatin sperma belum menjadi salah satu parameter klinik dalam penentuan fertilitas seorang pria sedangkan dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa abnormalitas pada kromatin sperma dapat menyebabkan infertilitas pada pria. Pemeriksaan kromatin sperma yang banyak digunakan adalah pemeriksaan biru anilin dan biru toluidin. Pemeriksaan biru anilin digunakan untuk melihat kematangan kromatin sperma dan pemeriksaan biru toluidin digunakan untuk melihat kepadatan kromatin sperma. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemeriksaan biru anilin dan biru toluidin sangat dianjurkan untuk melengkapi pemeriksaan analisis semen dalam pemeriksaan fertilitas pria.

### Abstract

**The Evaluation of Sperm Chromatin in Indicating Quality of Sperm.** There are infertility cases that is founded on man, which can't be explained. It encourages androlog and the researcher to find another examination besides men's fertility examination as commonly use in clinic. Nowadays, sperm chromatin is not becomea clinical parameter in deciding man fertility yet. According to some researchers, abnormality in sperm chromatin can influence infertility in man. Sperm chromatin's examination that is commonly use is aniline blue and toluidine blue examination. Aniline blue examination is used to see chromatin's sperm maturity and toluidine blue examination is used to see packaging of sperm chromatin. Some researchers told that aniline blue and toluidine blue examination is recomended to complete semen's analyzis in examine man's fertility.

**Keywords:** *sperm chromatin, quality of sperm*

### 1. Pendahuluan

Saat ini permasalahan reproduksi pria yang banyak mendapatkan perhatian adalah masalah infertilitas. Infertilitas pada pria mencapai angka 50% dari kasus infertilitas secara umum.<sup>1</sup> Dari 50% kasus tersebut, 6-27% merupakan kasus infertilitas pada pria yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya.<sup>1</sup> Berbagai penelitian telah dilakukan untuk dapat mengatasi masalah tersebut baik secara klinik maupun secara biologi molekuler. Dengan berkembangnya ilmu biologi molekuler, para ilmuan juga mulai mencoba memandang masalah infertilitas pada pria dari aspek molekuler untuk mencari penyebab infertilitas dan menemukan alternatif penatalaksanaan infertilitas yang lebih akurat. Salah satu penelitian yang berkembang saat ini terkait faktor-faktor yang berpengaruh pada fertilitas pria adalah

mengenai mekanisme epigenetik pada spermatogenesis.<sup>2</sup> Proses pergantian histon menjadi protamin pada saat spermiogenesis merupakan salah suatu mekanisme epigenetik yang ikut meregulasi diferensiasi spermatid menjadi spermatozoa dalam proses spermatogenesis.<sup>2,3</sup>

Kualitas kromatin sperma merupakan salah satu indikator yang menentukan kualitas sperma. Kualitas kromatin spermaditentukan oleh komposisi protamin dan histon yang terdapat pada sperma. Sperma yang matang mengandung minimal 85% protamin dan 15% histon.<sup>4</sup> Komposisi protamin yang lebih besar dibandingkan histon tersebut berperan dalam proses pengemasan DNA sperma menjadi lebih padat. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa kegagalan pergantian histon menjadi protamin dan kepadatan kromatin yang tidak optimal pada sperma berhubungan dengan terjadinya infertilitas pada

pria.<sup>5,6,7,8,9</sup> Aspek kematangan dan kepadatan kromatin sperma berperan dalam mengemas genom paternal menjadi sangat padat dalam nukleus sperma sehingga genom paternal dapat terlindungi dari enzim nuklease, mutagen, dan faktor lain yang dapat merusak DNA. Disamping itu, aspek kepadatan kromatin sperma juga berperan dalam membentuk nukleus sperma menjadi lebih hidrodinamik sehingga sperma dapat bergerak lebih cepat menuju ovum untuk melakukan fertilisasi.<sup>10</sup> Secara umum, kualitas kromatin sperma merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam proses fertilisasi sel ovum.<sup>11</sup>

Dalam menegakkan diagnosis dan memberikan penatalaksanaan pada pria yang mengalami infertilitas, praktisi kesehatan selama ini lebih berpatokan pada hasil analisis semen berupa motilitas, morfologi, dan konsentrasi sperma. Selain itu juga, telah umum dilakukan pemeriksaan integritas DNA sperma dan imunologi sperma yang dapat menentukan kualitas sperma. Namun melalui pemeriksaan tersebut, tidak semua penyebab infertilitas pada pria dapat diketahui sehingga masih terdapat 6-27% dari kasus infertilitas secara umum yang tergolong infertilitas pria yang tidak dapat dijelaskan. Terkait hal tersebut, pemeriksaan kualitas kromatin sperma dapat dijadikan sebagai salah satu indikator tambahan dalam menentukan kualitas sperma sehingga lebih mempertajam diagnosis etiologi dan penatalaksanaan infertilitas pada pria.

## 2. Pembahasan

### Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan suatu proses pembentukan gamet pada pria berupa sperma. Proses ini terjadi di testis pada struktur yang disebut sebagai tubulus seminiferus. Pembentukan sperma ini dimulai pada saat pubertas, ketika produksi hormone gonadotropin sudah cukup maksimal untuk merangsang pembentukan spermatozoa. Pada mulanya, diwaktu masih dalam kandungan, sel-sel germinal primordial tampak pada tingkat perkembangan awal di antara sel endoderm di dinding kantung kuning telur di dekat allantois. Kemudian pada minggu ke-3 masa janin, mereka akan bermigrasi ke rigi urogenital yang saat itu tumbuh di daerah lumbal. Semenjak dari dalam kandungan sampai masa pubertas nanti, sel-sel germinal primordial ini akan mengalami fase istirahat, sampai suatu saat ketika lumen tubulus seminiferus telah sempurna dibentuk pada pubertas, mereka akan berdiferensiasi menjadi spermatogonia. Spermatogonia terdiri atas 2 tipe yaitu spermatogonia tipe A dan spermatogonia tipe B.<sup>12,13</sup>

Spermatogonia tipe A adalah spermatogonia awal yang dibentuk. Seiring perkembangan ilmu pengetahuan, saat ini diketahui bahwa spermatogonia tipe A ini akan mengalami serangkaian fase pembelahan secara mitosis, dan akhirnya membentuk spermatogonia tipe B. Spermatogonia

tipe B ini kemudian yang akan bergerak ke lumen, termodifikasi dan membesar membentuk spermatosit primer. Spermatosit primer nantinya akan semakin ke arah lumen sambil membelah secara meiosis menjadi spermatosit sekunder. Pada fase meiosis pertama, proses yang berlangsung cukup lama adalah pada tahap profase I, yakni sekitar 22 hari. Sedangkan proses selanjutnya yakni metafase, anafase dan telofase berlangsung dengan cepat. Setelah terbentuk spermatosit sekunder, alamiahnya ia akan langsung membelah kembali secara meiosis (meiosis II) menjadi spermatid. Spermatid yang dihasilkan sekarang telah haploid, atau memiliki setengah dari kromosom induknya (spermatosit primer). Langkah selanjutnya adalah tahap dimana spermatid berdiferensiasi menjadi spermatozoa.

Hasil akhir dari spermatogenesis adalah spermatozoa yang haploid (n), dimana satu spermatosit primer menghasilkan empat spermatozoa. Proses ini berlangsung di dalam testis lebih kurang selama 64 hari, dimana sebenarnya spermatozoa yang terbentuk adalah sekitar 300 juta sel spermatozoa baru setiap hari.<sup>14</sup>

### Struktur Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel yang sangat terspesialisasi dan padat yang tidak lagi mengalami pembelahan atau pertumbuhan, berasal dari gonosit yang menjadi spermatogonium, spermatosit primer dan sekunder dan selanjutnya berubah menjadi spermatid dan akhirnya berubah menjadi spermatozoa. Spermatozoa terdiri atas dua bagian fungsional yang penting yaitu kepala dan ekor.<sup>13,14,15</sup>

Kepala spermatozoa bentuknya bulat telur dengan ukuran panjang 5 mikron, diameter 3 mikron dan tebal 2 mikron yang terutama dibentuk oleh nukleus yang mengandung informasi genetik sifat penurunan ayah dalam molekul DNA. Pada bagian anterior kepala spermatozoa terdapat akrosom, suatu struktur yang berbentuk topi yang menutupi dua per tiga bagian anterior kepala dan mengandung sejumlah enzim hidrolitik. Enzim tersebut terdiri dari; hialuronidase, akrosin, dan *Corona Penetrating Enzim* (CPE) yang semuanya penting untuk penembusan ovum (sel telur) pada proses fertilisasi.<sup>13,14,15</sup>

Ekor dibedakan atas 3 bagian yaitu bagian tengah (*midpiece*), bagian utama (*principle piece*) dan bagian ujung (*endpiece*). Panjang ekor seluruhnya sekitar 55 mikron dengan diameter yang makin ke ujung makin kecil: di depan 1 mikron, di ujung 0,1 mikron. Panjang bagian tengah: 5-7 mikron, tebal 1 mikron; bagian utama panjang 45 mikron, tebal 0,5 mikron dan bagian ujung panjang 4-5 mikron, tebal 0,3 mikron. Bagian ekor tidak bisa dibedakan dengan mikroskop cahaya tetapi harus dengan mikroskop elektron.<sup>13,14,15</sup>

Pada bagian *midpiece* sperma, dijumpai adanya struktur mitokondria yang berfungsi sebagai pembangkit energi pada spermatozoa. Bagian *principle pieces* sperma dibungkus oleh sarung fibrous (*fibrous sheath*) yang perbatasannya disebut anulus. Sarung fibrous bentuknya terdiri dari kolom ventral dan dorsal yang masing-masing melalui rusuk-rusuk. Ke arah sentral ada semacam tonjolan yang memegang cincin nomor 3, 8 dari aksonema. Keduanya (tahanan rusuk dan pegangan cincin aksonema) memberikan gerak tertentu.<sup>13,14,15</sup>

### Kromatin Sperma Manusia

Kromatin sperma manusia memiliki struktur terorganisasi yang tersusun dari DNA dan nukleoprotein yang heterogen. Salah satu aspek yang membedakan kromatin sperma dengan kromatin sel somatik adalah komposisi protamin dan histon yang menjadi salah satu komponen nukleoprotein dari kromatin. Pada kromatin sel somatik, komposisi histon lebih banyak dibandingkan protamin sedangkan pada kromatin sperma, komposisi protamin lebih dominan dibandingkan dengan histon.<sup>16</sup>

Komposisi protamin yang lebih dominan dibandingkan dengan histon pada sel sperma disebabkan oleh adanya proses pergantian histon menjadi protamin pada saat spermiogenesis yang diregulasi melalui proses epigenetik.<sup>17</sup> Epigenetik merupakan suatu proses yang ikut meregulasi perubahan fenotip atau ekspresi genetik melalui perubahan pada struktur DNA dan histon yang tidak menyebabkan perubahan pada sekuens DNA. Mekanisme epigenetik dapat melalui proses metilasi DNA atau modifikasi histon.<sup>2</sup> Pada spermatogenesis, histon mengalami modifikasi posttranslasi yang mengubah interaksi histon dengan DNA dan protein lain dalam inti sel. Modifikasi tersebut merupakan suatu mekanisme epigenetik melalui proses metilasi, fosforilasi, ataupun ubiquitinasi. Kombinasi-kombinasi yang terjadi dari modifikasi lima protein penyusun histon tersebut oleh para peneliti diduga menjadi suatu "kode histon" yang berperan dalam beberapa proses biologis seperti regulasi gen, kondensasi kromosom, dan juga spermatogenesis.

Dalam proses spermatogenesis terdapat serangkaian modifikasi histon mulai dari fase meiosis sampai dengan fase spermiogenesis. Pada fase miosis, terjadi metilasi, fosforilasi, ataupun ubiquitinasi dengan bantuan enzim spesifik pada lokasi tertentu dari kompleks histon. Selanjutnya histon tersebut akan digantikan oleh histon yang spesifik pada testis (H1-t, H3-t, H2A-t, H2B-t, H2A-x, dan H3.3) selama proses meiosis. Hiperasetilasi dari varian histon H4 (H4-t) menjadi faktor kunci terjadinya relaksasi pengemasan DNA akibat menurunnya stabilitas ikatan antara histon dan DNA yang selanjutnya memfasilitasi pertukaran histon yang spesifik pada testis menjadi protein transisi (TP1 dan TP2), sedangkan enzim topoisomerase 1 mengurangi daya torsi dengan memecah untaian ganda sehingga selanjutnya protamin akan

menggantikan protein transisi mengemas untaian DNA menjadi lebih kompak enam kali lipat dibandingkan pada nukleosom somatik.<sup>3</sup>

Protein histon yang merupakan protein dasar yang kaya akan residu lisin dan arginin serta terdiri atas lima macam protein yaitu H1, H2A, H2B, H3, dan H4. Protein histon tersebut digunakan untuk menggulung molekul DNA sehingga menjadi struktur lebih padat dimana dalam satu gulungan molekul DNA terdapat kompleks histon yang tersusun atas satu molekul H1 dan masing-masing dua molekul H2A, H2B, H3, dan H4.<sup>18</sup>

Protamin merupakan protein dasar pada nukleus sperma yang tersusun atas 100 asam amino memiliki karakteristik kaya akan residu arginin dan sistein<sup>19,20</sup> Kandungan arginin yang tinggi ini menyebabkan ikatan protamin dengan DNA menjadi sangat kuat pada gugus fosfatnya.<sup>20,21</sup> Residu sistein memfasilitasi pembentukan ikatan disulfida antara protamin yang satu dengan yang lain dan ikatan disulfida intra protamin untuk mengemas kromatin secara optimal sehingga dapat menunjang fungsi sperma yang normal.<sup>22</sup> Pada sperma manusia, 85% histon akan digantikan oleh protamin dalam proses spermatogenesis yang diregulasi oleh mekanisme epigenetik.<sup>23</sup> Protamin ini akan mengemas DNA sperma secara optimal sehingga terjadi peningkatan kondensasi kromatin yang akan melindungi integritas genetik genom paternal dari enzim nuklease, mutagen, dan faktor lain yang dapat merusak DNA selama proses transpor dari saluran reproduksi pria ke saluran reproduksi wanita.<sup>24</sup>

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa kegagalan pergantian histon menjadi protamin pada proses spermatogenesis dan kepadatan kromatin yang tidak optimal pada sperma berhubungan dengan terjadinya infertilitas pada pria.<sup>5,6,7,8,9</sup>

### Evaluasi Kromatin Sperma

Pemeriksaan integritas DNA sperma telah umum dilakukan sebagai pemeriksaan tambahan untuk menunjang pemeriksaan analisis semen dalam menegakkan diagnosa etiologi dari infertilitas pria. Banyak teknik yang dapat dilakukan untuk pemeriksaan integritas DNA, namun semua pemeriksaan tersebut pada umumnya membutuhkan peralatan dan biaya yang cukup mahal. Dari pemeriksaan integritas DNA, dapat diketahui tingkat fragmentasi pada DNA sperma yang selanjutnya akan mempengaruhi kualitas sperma. Berdasarkan uraian sebelumnya, bahwa integritas DNA pada sperma dilindungi oleh kromatin sperma, sehingga secara teori integritas DNA memiliki korelasi dengan kualitas kromatin sperma. Pemeriksaan kualitas kromatin sperma terdiri atas pemeriksaan kematangan kromatin dan kepadatan kromatin sperma. Pemeriksaan kematangan kromatin sperma yang banyak digunakan dalam penelitian adalah pemeriksaan sperma dengan pewarnaan biru anilin<sup>25</sup>, sedangkan pemeriksaan

kepadatan kromatin sperma yang banyak digunakan dalam penelitian adalah pemeriksaan sperma dengan pewarnaan biru toluidin<sup>25,26</sup>. Kedua teknik pemeriksaan ini banyak digunakan karena memerlukan peralatan yang sederhana, praktis dalam pelaksanaannya, dan memerlukan biaya yang tidak mahal.<sup>27,28,29</sup>

### Pewarnaan Biru Anilin

Pewarnaan biru anilin merupakan suatu teknik pewarnaan yang telah banyak digunakan dalam bidang biologi. Dalam aplikasinya, pewarnaan biru anilin telah digunakan untuk beberapa pewarnaan, diantaranya adalah untuk pewarnaan jaringan tulang rawan, mitokondria, telur kutu, dan sedimen urin. Zat warna biru anilin merupakan zat warna dari kelas triphenylmethane yang larut dalam air dan etanol serta memiliki bentuk fisik berupa bubuk berwarna biru tua. Zat warna ini memiliki rumus molekul  $C_{17}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$  dengan berat molekul 799,80.<sup>30</sup> Zat warna ini juga digunakan untuk pewarnaan sperma dengan tujuan untuk mengidentifikasi kematangan kromatin sperma. Prinsip pewarnaan biru anilin pada sperma adalah membedakan nukleus sperma yang mengandung kromatin matang dengan yang tidak matang. Nukleus sperma dengan kromatin yang tidak matang, mengandung banyak histon yang kaya akan residu lisin sehingga akan memberikan reaksi positif dengan pewarnaan biru anilin, sedangkan nukleus sperma dengan kromatin yang matang, lebih banyak mengandung protamin yang kaya akan residu sistein sehingga akan memberikan reaksi negatif pada pewarnaan biru anilin.<sup>25</sup>

Pada pewarnaan sperma dengan biru anilin, adapun bahan-bahan yang diperlukan antara lain; larutan glutaraldehid 3%, larutan *phosphat buffer saline* (PBS), serta zat warna biru anilin 5% (pH 3,5). Untuk glutaraldehid 3% dibuat dengan cara melarutkan tiga ml larutan glutaraldehid dalam larutan PBS hingga volume total larutannya menjadi 100 ml. Untuk pembuatan larutan pewarnaan biru anilin 5% (pH 3,5) dibuat dengan cara menimbang satu gram biru anilin lalu dilarutkan dalam larutan PBS sampai volume total larutannya menjadi 20 ml. Selanjutnya larutan dipanaskan sampai bubuk biru anilin larut lalu setelah itu disaring dengan kertas saring. Selanjutnya larutan biru anilin ini diatur pH nya sampai 3,5 dengan penambahan asam asetat glasial.<sup>31</sup>

Adapun cara kerja pewarnaan sperma dengan biru anilin adalah dimulai dengan membiarkan semen yang baru diejakulasi selama 30-60 menit untuk mencapai likuifaksi yang sempurna. Setelah mengalami likuifaksi sempurna, cairan semen dibuat sediaan hapus pada slide mikroskop. Selanjutnya sediaan hapus difiksasi dengan larutan Glutaraldehyde 3% dalam PBS selama 30 menit. Setelah itu, sediaan hapus dicelupkan dua kali dalam larutan PBS selama lima menit lalu dikeringkan di udara. Setelah kering, sediaan hapus diwarnai dengan larutan biru

anilin (pH 3,5) dan biarkan selama tujuh menit. Selanjutnya sediaan hapus yang telah diwarnai, dibilas dengan larutan PBS dan dikeringkan di udara bebas. Setelah itu, preparat di pasang *cover glass* menggunakan enthelan. Selanjutnya preparat siap untuk diperiksa.<sup>31</sup>

Pemeriksaan preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Pengamatan dilakukan dengan mengamati warna kepala sel sperma secara random dari 200 sperma. Kepala sperma yang kromatinnya matur akan berwarna jernih (tidak terwarnai) sedangkan kepala sperma yang kromatinnya immatur akan berwarna biru.<sup>31</sup> Setelah dihitung lalu ditentukan persentasenya masing-masing. Untuk mengurangi subjektivitas, pengamatan dilakukan oleh dua orang yang hasil persentasenya kemudian dirataratakan. Untuk penilaian semen yang normal, kepala sperma yang mengandung kromatin matang (tidak terwarnai) meliputi minimal 75% dari 200 sperma yang diamati sedangkan kepala sperma yang mengandung kromatin tidak matang (berwarna biru) meliputi maksimal 25% dari 200 sperma yang diamati.<sup>32</sup>

Berdasarkan penelitian Foresta dkk (1992) yang meneliti abnormalitas histon yang persisten pada sperma pria infertil menggunakan pewarnaan biru anilin yang hasilnya menunjukkan bahwa pemeriksaan biru anilin ini dapat memproyeksikan hubungan antara abnormalitas kromatin sperma dengan infertilitas pada pria.<sup>25,33</sup> Hubungan antar hasil pemeriksaan biru anilin dengan parameter analisis semen (motilitas, konsentrasi, dan morfologi) masih kontroversial, karena dari beberapa penelitian terkait hal tersebut memberikan hasil yang tidak seragam. Dari penelitian Franken dkk (1999) yang mengevaluasi morfologi sperma dengan kematangan kromatin menggunakan pewarnaan biru anilin yang hasilnya menunjukkan bahwa persentase teratozoospermia yang tercatat dengan anilin blue (51%) lebih tinggi dibandingkan yang normozoospermia (26%).<sup>34</sup> Namun dari beberapa penelitian yang lain menunjukkan bahwa tidak ada korelasi antara parameter analisis semen dengan hasil pemeriksaan biru anilin.<sup>25</sup> Berdasarkan penelitian Hammadeh dkk (1998) yang meneliti hubungan kematangan kromatin sperma dengan tingkat fertilisasi, pembelahan sel, dan kehamilan pada program IVF menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan biru anilin memiliki korelasi yang signifikan dengan tingkat kehamilan sehingga dapat dijadikan sebagai indikator dalam memprediksi keberhasilan kehamilan dalam program IVF.<sup>25,35</sup>

### Pewarnaan Biru Toluidin

Pewarnaan biru toluidin merupakan suatu teknik pewarnaan yang juga telah banyak digunakan dalam bidang biologi. Dalam aplikasinya, pewarnaan biru toluidin telah digunakan untuk beberapa pewarnaan, diantaranya adalah untuk pewarnaan ekspresi gen, sel saraf, lesi pada mulut, sel ginjal, dan sputum.<sup>30</sup> Zat warna biru anilin merupakan

zat warna dari golongan fenotiazin yang larut dalam air dan etanol serta memiliki bentuk fisik berupa bubuk berwarna hijaugelap. Zat warna ini memiliki rumus molekul  $C_{15}H_{16}N_3S$  dengan berat molekul 305,83.<sup>30</sup> Zat warna ini juga digunakan untuk pewarnaan sperma dengan tujuan untuk mengidentifikasi kepadatan kromatin sperma. Prinsip pewarnaan biru toluidin adalah zat warna biru toluidin akan diikat oleh gugus fosfat dari untaian DNA sperma yang memiliki kepadatan kromatin yang kurang baik. Sedangkan sperma yang memiliki kepadatan kromatin yang baik akan terwarnai minimal atau tidak terwarnai oleh zat warna biru toluidin.<sup>26</sup>

Pada pewarnaan sperma dengan biru toluidin, adapun bahan-bahan yang diperlukan antara lain; etanol 96%, larutan acetone, larutan HCl 0,1 N, larutan biru toluidin 0,05% dimana buffer biru toluidin terdiri dari 50% phosphate sitrat (*McIlvain* buffer, pH 3,5), larutan n-butanol, dan Xylol. Larutan HCl 0,1 N dibuat dengan cara melarutkan 1,7 ml HCl pekat dalam larutan akuades hingga volume totalnya menjadi 200 ml. Larutan biru toluidin dibuat dengan cara menimbang 0,01 gram biru toluidin lalu dilarutkan dalam campuran larutan buffer hingga volume totalnya menjadi 20 ml. Larutan buffer biru toluidin dibuat dengan cara mencampurkan larutan akuades dan *McIlvain* buffer (pH 3,5) dengan perbandingan 1:1.<sup>31</sup> Adapun cara kerja pewarnaan sperma dengan biru toluidin adalah dimulai dengan membiarkan semen yang baru diejakulasi selama 30-60 menit untuk mencapai likuifaksi yang sempurna. Setelah mengalami likuifaksi sempurna, cairan semen dibuat sediaan hapus pada slide mikroskop. Selanjutnya sediaan hapus difiksasi dengan larutan etanol 96% - acetone (1:1) pada suhu 4°C selama 30 menit. Setelah itu, sediaan hapus dihidrolisa dalam larutan 0,1 N HCl pada suhu 4°C selama lima menit. Selanjutnya, sediaan hapus dibilas tiga kali menggunakan air suling masing-masing selama dua menit dan dibiarkan mengering di udara. Setelah kering, sediaan hapus diwarnai dengan larutan biru toluidin 0,05% dan biarkan selama 10 menit. Selanjutnya sediaan hapus yang telah diwarnai, dibilas dengan air suling lalu didehidrasi menggunakan n-butanol sebanyak dua kali masing-masing selama tiga menit pada suhu 37°C untuk selanjutnya dicelupkan dalam larutan xylol sebanyak dua kali selama tiga menit. Setelah kering, preparat kemudian ditutup dengan *cover glass* menggunakan enthelan untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan.<sup>31</sup>

Pemeriksaan preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Pengamatan dilakukan dengan mengamati warna kepala sel sperma secara random dari 200 sperma. Kepala sperma yang kepadatan kromatinnya baik akan berwarna biru terang atau jernih sedangkan kepala sperma yang memiliki kepadatan kromatin yang kurang baik akan berwarna ungu atau violet.<sup>31</sup> Setelah dihitung lalu ditentukan

persentasenya masing-masing. Untuk mengurangi subjektivitas, pengamatan dilakukan oleh dua orang yang hasil persentasenya kemudian dirata-ratakan. Untuk penilaian semen yang normal, kepala sperma yang mengandung kepadatan kromatin yang baik (berwarna biru terang atau jernih) meliputi minimal 65% dari 200 sperma yang diamati sedangkan kepala sperma yang mengandung kepadatan kromatin yang kurang baik (berwarna biru gelap atau ungu) meliputi kurang 35% dari 200 sperma yang diamati.<sup>36</sup>

Berdasarkan penelitian Erenpreiss dkk (2009) yang mengevaluasi pewarnaan biru toluidin pada sperma pria yang fertil dan pria yang infertil menunjukkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok pria yang fertil dengan kelompok pria yang infertil berdasarkan hasil pemeriksaan biru toluidin tersebut sehingga disimpulkan bahwa pemeriksaan biru toluidin ini dapat digunakan untuk pemeriksaan tambahan dalam menegakkan diagnosa infertilitas pada pria.<sup>26</sup> Berdasarkan penelitian Erenpreisa dkk (2002) serta Erenpreiss dkk (2004) yang meneliti hubungan antara beberapa pemeriksaan integritas DNA seperti SCSA, tes TUNEL, dan tes *acridine orange* dengan hasil pemeriksaan pengecatan biru toluidin ternyata menunjukkan adanya korelasi yang signifikan antara hasil pemeriksaan integritas DNA (SCSA, tes TUNEL, dan tes *acridine orange*) dengan hasil pemeriksaan pengecatan biru toluidin sehingga pemeriksaan ini juga dapat digunakan untuk melihat integritas DNA dengan teknik yang lebih simpel dan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan pemeriksaan integritas DNA lainnya.<sup>36,37</sup>

### 3. Kesimpulan

Aspek kromatin sperma saat ini belum menjadi salah satu parameter dalam menentukan fertilitas pria sedangkan dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa abnormalitas pada kromatin sperma dapat menyebabkan infertilitas pada pria. Dari beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa pemeriksaan kualitas kromatin spermasangat dianjurkan untuk melengkapi pemeriksaan analisis semen dalam pemeriksaan fertilitas pria terutama pada kasus infertilitas pria yang tidak dapat dijelaskan.

### Daftar Acuan

1. Hamada Alaa, Esteves SC, Agarwal A. Unexplained male infertility: potensial causes and management. *Human Andrology*. 2011.p.2-16.
2. Rajender Singh, Avery Kelsey, Agarwal Ashok. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*. 2011; 727. p.62-71.
3. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Human Reproduction Update*. 2007; 13(3). p. 313-327.

4. Zini A, Agarwal A. Sperm chromatin. Springer. New York. 2011. p. 29.
5. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males, Human Reproduction. 2005; 20. p. 1298–1306.
6. Aoki VW, Liu L, Emery BR, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA Integrity, Journal of Andrology. 2006; 27(6). p. 890–898.
7. Hekmatdoost Azita dkk. Sperm chromatin integrity: etiologies and mechanisms of abnormality, assays, clinical importance, preventing and repairing damage. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2009; 1(3). p. 147-160.
8. Tsarev I dkk. Evaluation of male fertility potential by toluidine blue test for sperm chromatin structure assessment. Human Reproduction. 2009; 24 (7). p. 1569-1574.
9. Erenpreiss J dkk. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. Human Reproduction. 2004; 19 (10). p. 2277-2282.
10. Olivia Rafael. Protamines and male infertility. Human Reproduction. 2006; 12 (4). p. 417-435.
11. Golan R dkk. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. Molecular Human Reproduction . 1997; 3(1). p.47-54.
12. Arey LB. Developmental anatomy. A textbook and laboratory manual of embryology. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1957.
13. Nieschlag E, Behre H M, Andrology male reproductive health and dysfunction. 3<sup>rd</sup> Ed. Springer. New York. 2010. p. 16-21.
14. Campbell N A, Reece J B, Urry L A, et all. Biology. 8<sup>th</sup> Ed. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco. 2008.
15. Alberts Bruce, Jhonson Alexander, Lewis Julian, et all. Molecular biology of the cell. 5<sup>th</sup> Ed. Garland Science. United States of America. 2008.
16. Corzett M, Mazrimas J and Balhorn R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. Molecular Reproduction Dev. 2002(61). p.519–527.
17. Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. Science. 2002( 296).p.2176–2178.
18. Yuwono T. Biologi molekular. Erlangga. Jakarta. 2005.
19. Kasinsky HE dkk. Protamines: structural complexity, evolution and chromatin patterning. Protein & Peptide Letters. 2011(18). p.755-771.
20. Balhorn R, Brewer L and Corzett M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. Molecular Reproduction Dev. 2000(56). p. 230–234.
21. Le Lannic G, Arkhis A, Vendrely E, Chevaillier P and Dadoune JP. Production, characterization, and immunocytochemical applications of monoclonal antibodies to human sperm protamines. Molecular Reproduction Dev. 1993(36). p.106–112.
22. Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. Anatomy Embryology (Berl). 1999(199). p. 471–487.
23. Oliva R and Dixon GH. Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure. Journal Molecular. 1990(30). p.333–346.
24. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. Human Reproduction. 1997 (12). p.1531-1536.
25. Agarwal A, Erenpreiss J, Sharma R. Sperm chromatin assessment. In Textbook of assisted reproductive technologies laboratory and clinical perspectives. 3<sup>th</sup> Ed. Informa. United Kingdom. 2009.
26. Tsarev I dkk. Evaluation of male fertility potential by toluidine blue test for sperm chromatin structure assessment. Human Reproduction. 2009; 1(1).p. 1-6.
27. Lamirande E, Gabriel MS, Zini A. Human sperm chromatin undergoes physiological remodeling during in vitro capacitation and acrosome reaction. Journal of Andrology. 2012;33(5). p. 1025-1035.
28. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. Andrologia. 1998;30. p. 29-35.
29. Erenpreiss Juris dkk. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. Asian Journal Andrology. 2006;8(1). p. 11-29
30. Sabnis RW. Handbook of biological dyes and stains. Jhon Wiley & Sons Inc. New Jersey.2010.
31. Erenpreiss Juris dkk. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. Journal of Andrology. 2001; 22(1). p. 45-53.
32. Hammadeh ME dkk. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. Human Reproduction. 1996;11(11). p. 2468-2471.
33. Foresta C, Zorzi M, Rossato M dkk. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl*. 1992;15. p. 330–337.
34. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and

- chromomycin A3 staining. *Andrologia*. 1999; 31(6). p. 361–366.
35. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia*. 1998;30. p. 29-35.
36. Erenpreisa Jekaterina dkk. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Wiley Interscience*. 2003;52. p. 19-27.
37. Erenpreiss J dkk. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Human Reproduction*. 2004; 19(10). p. 2277-2282.