

ANALISIS KUALITAS SPERMA TIKUS PERCOBAAN (Jumlah, Motilitas, dan Morfologi)



**M. Ja'far Luthfi
Mahanem Mat Noor**

**ANALISIS KUALITAS SPERMA TIKUS PERCOBAAN
(JUMLAH, MOTILITAS, DAN MORFOLOGI)**

Dr. M. Ja'far Luthfi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

Prof. Dr. Mahanem Mat Noor

Universiti Kebangsaan Malaysia

Daftar Isi

Judul	i
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iii
Bab. I Analisis Kualitas Sperma dalam Penilaian Kesuburan	1
Pendahuluan	1
Penggunaan Hewan dalam Penilaian Sistem Reproduksi Jantan	2
Penggunaan Tikus (Rodensia) sebagai Hewan Percobaan	3
Parameter Kesuburan Jantan	4
Analisis Kualitas Sperma	5
Bab. II Sistem Reproduksi Jantan	7
Testes	7
Spermatogenesis	10
Spermiogenesis	11
Pematangan Epididimis	12
Struktur Sperma	13
Kepala Sperma	14
Flagela (ekor) Sperma	15
Metabolisme Tenaga pada Sperma	16
Pengaruh Suatu Bahan Terhadap Sistem Reproduksi	18
Bab. III Teknik Preparasi Sampel Sperma	22
Pendahuluan	22
Spesies	22
Umur Hewan	22
Metode post mortem	22
Sampling	23
Medium	25
Pembuatan Suspensi Sperma	26
Bab. IV Jumlah Sperma	27
Prinsip	29
Protokol	30
Hasil	33
Penghitungan Bilangan Sperma per Kauda Epididimis	37
Contoh Penghitungan	38
Alat dan Bahan	39
Komposisi Medium Biggers, Whitten & Whittingham (BWW)	39

Bab. V Motilitas Sperma	40
Prinsip	40
Protokol	41
Kalkulasi	42
Hasil	42
Alat dan bahan	43
Bab. VI Morfologi Sperma	44
Menghitung Bentuk Abnormal	45
Prinsip	46
Protokol	49
Kalkulasi dan Hasil	50
Alat dan Bahan	52
Penyediaan Pewarna Giemsa	52
Referensi	53
Index	59

BAB I

Analisis Kualitas Sperma dalam Penilaian Kesuburan

Pendahuluan

Konsep penggunaan hewan percobaan untuk mendeteksi perubahan fungsi reproduksi jantan bukanlah hal baru. Kajian seperti ini sudah dimulai sejak awal tahun 1930 (Amann 1986). Penggunaan hewan merupakan model pengujian yang penting karena mencerminkan keefektifan, efek samping, ataupun toksisitas suatu bahan secara keseluruhan. Eksperimen ini perlu dilakukan sebelum uji klinis karena banyak aspek fisiologi dan biologi reproduksi tidak dapat dikaji secara langsung pada manusia (Farnsworth 1992; Plant & Marshall 2001). Hingga kini metode tersebut masih merupakan pilihan utama dalam penilaian bioaktivitas maupun toksisitas suatu bahan terhadap sistem reproduksi (Huang et al. 2004).

Berbagai jenis hewan digunakan dalam pengujian sistem reproduksi jantan, masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Namun demikian tikus paling banyak digunakan untuk keperluan ini atas beberapa alasan. Tikus merupakan hewan yang mirip dengan manusia dari segi tertentu. Hewan ini juga relatif mudah dibiakkan dan dipelihara. Tambahan lagi, tikus telah digunakan sebagai hewan percobaan dalam skrining suatu senyawa untuk mengetahui efek farmakologi meliputi distribusi, mekanisme, dan toksisitasnya (Briggs & Oehme 1980; Wier & Rumberger, 1995). Penggunaannya secara luas dalam penelitian telah menghasilkan data biologi yang cukup lengkap (Golden 2002; White 2001).

Beberapa metode penilaian sistem reproduksi jantan telah ditetapkan dan terus dikembangkan. Salah satu yang paling banyak digunakan ialah analisis kualitas sperma. Analisis kualitas sperma dapat memberikan informasi tentang status kesuburan organ genital jantan. Selain diperlukan dalam kajian deskriptif tentang gambaran

sperma suatu hewan, analisis kualitas sperma juga digunakan dalam kajian toksikologi atau farmakologi suatu bahan terhadap kesuburan jantan. Analisis ini dapat menunjukkan peningkatan atau penurunan kesuburan suatu hewan percobaan (Rodriguez-Martinez, 2006; Hawcroft et al. 1987; Hamburger & Hostettmann 1991; Huggins, 2003).

Tujuan dari analisis kualitas sperma ialah untuk menilai parameter deskriptif dari sampel sperma hewan percobaan. Kualitas yang umumnya dinilai ialah jumlah sperma (bilangan/ kepekatan/ konsentrasi sperma), motilitas sperma, dan morfologi sperma. Penentuan jumlah sperma, motilitas sperma, dan morfologi sperma adalah aspek-aspek terpenting dalam analisis kualitas sperma (Nallella et al. 2006; Perreault & Cancel, 2001; Horimoto et al. 2000). Parameter-parameter tersebut adalah indikator utama dalam penilaian klinis dan toksikologi dari fungsi reproduktif jantan (Working & Hurtt. 1987).

Penggunaan Hewan dalam Penilaian Sistem Reproduksi Jantan

Penggunaan hewan percobaan merupakan kaedah yang paling tepat untuk menunjukkan potensi suatu bahan, karena memberi informasi tentang aktivitas biologi suatu bahan secara langsung. Pengujian ini melibatkan pemberian kuantitas tertentu suatu bahan untuk diuji ke sistem biologi (hewan percobaan), yang akan bereaksi terhadap stimulus yang diberikan (Walsh 2003).

Pengujian melibatkan pengukuran reaksi setelah aplikasi suatu stimulus pada sistem biologi:

STIMULUS + SISTEM BIOLOGI → REAKSI

Stimulus ialah sampel yang mengandung bahan yang akan diujikan. Sistem biologi yang menerima stimulus yaitu organisme (hewan atau tumbuhan), organ atau jaringan, sel atau sistem makromolekul (enzim, antibodi). Reaksi adalah perubahan yang dapat diamati pada beberapa aspek dari sistem biologi. Hasil pengamatan dapat berupa

reaksi positif (penambahbaikan aktivitas) atau reaksi negatif (toksisitas, kegagalan atau kematian suatu sistem biologi) (Hawcroft et al. 1987).

Aktivitas (bermanfaat atau merugikan) dapat ditunjukkan atau disimpulkan dengan memberikan suatu bahan/agen/senyawa kepada hewan percobaan dan mengamati pengaruhnya pada sistem biologi. Untuk menentukan apakah suatu perlakuan menunjukkan aktivitas yang signifikan dibandingkan keadaan normal, disediakan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan sebagai pembanding. Kelompok kontrol diberikan pelarut atau bahan suspensi yang digunakan pada perlakuan dalam volume sama (Reinhard 1982). Metode ini dikenal sebagai *screening hipokratik*, yaitu pengujian menggunakan kelompok hewan yang kondisinya normal (sehat). Screening hipokratik didasarkan pada premis bahwa pengaruh suatu bahan (agen, senyawa) dapat diketahui dari perubahan yang terjadi pada kelompok hewan yang diberi perlakuan dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan (kelompok kontrol) (Hamburger & Hostettmann 1991).

Penggunaan Tikus (Rodensia) sebagai Hewan Percobaan

Berbagai jenis hewan percobaan yang tersedia untuk pengujian memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Tikus banyak digunakan dalam penelitian karena berbagai alasan praktis. Hewan ini mudah dipelihara dan dibiakkan serta telah digunakan sebagai hewan percobaan untuk mengetahui efek farmakologi meliputi distribusi, mekanisme, dan toksisitasnya (Briggs & Oehme 1980). Tikus merupakan model yang menyerupai manusia dari segi tertentu. Pemberian dosis dapat dilakukan sesuai dengan cara yang diinginkan, bahan didistribusikan dan dimodifikasi melalui mekanisme fisiologi dan biokimia yang akan menentukan kepekatan bahan atau metabolit aktifnya pada organ sasaran (Rodrigues 1997; Working 1988). Bahan yang diambil per oral mula-mula didistribusikan ke hati, kemudian mengalami metabolisme dan sebagian akan dikeluarkan dari tubuh. Penelitian menggunakan

hewan model memamerkan reaksi keseluruhan organisme hidup yang dihasilkan dari interaksi kompleks antara molekul, sel dan jaringan (Kierszenbaum 1994; Preusch 2004). Interaksi kompleks demikian tidak tersedia dalam sistem *in vitro* (Purchase et al. 1998). Molekul terisolasi (*isolated molecul*) dan kajian *in vitro* tidak selalu mencerminkan keadaan *in vivo* dan tidak mencerminkan fungsi jaringan, organ dan sistem organ yang sesungguhnya (Kierszenbaum 1994; Preusch 2004). Huggins (2003) menyarankan pengujian *in vivo* pada tahap awal skrining untuk melihat apakah memang suatu senyawa betul-betul berpengaruh terhadap sistem reproduksi (Golden 2002).

Program penemuan obat baru sering didasarkan pada penggunaan rodensia untuk menentukan toksikologi, farmakologi dan metabolisme senyawa/bahan kimia (Briggs & Oehme 1980). Eksperimen yang melibatkan hewan model penting dari aspek klinis karena banyak aspek fisiologi dan biologi reproduksi manusia tidak dapat dikaji secara langsung atas alasan etik (Plant & Marshall 2001). Pengujian secara konvensional suatu bahan menggunakan rodensia sebagai hewan model kajian sangat diperlukan sebelum uji praklinis dan klinis dapat dilakukan (Farnsworth 1992). Hasilnya akan dapat menjadi rujukan bagi penentuan arah tuju pengembangan obat untuk pengujian praklinis (Greaves 1990).

Parameter kesuburan jantan

Kemampuan reproduksi jantan secara sederhana bermakna kesuburan. Namun demikian kesuburan adalah ekspresi akhir dari berbagai faktor, dan kesuburan jantan tidak dapat ditentukan secara pasti tanpa pasangan betina subur. Faktor-faktor dalam proses pembuahan dan terjadinya kebuntingan meliputi psikologi, genetik, dan lingkungan yang mempengaruhi baik jantan maupun betina.

Kesuburan jantan didefinisikan sebagai kemampuan menghasilkan sperma yang dapat membuahi pasangannya dalam masa tertentu melalui persetubuhan (Niederberger 2007). Banyak

faktor berperan dalam keberhasilan pembuahan (Hirsh, 2003). Dari pihak jantan, spermatogenesis yang normal, jumlah, motilitas dan morfologi sperma yang bagus serta libido yang berfungsi baik penting untuk keberhasilan pembuahan. Kualitas sperma yang rendah merupakan penyebab utama ketidaksuburan jantan (Hirsh 2003).

Terdapat beberapa parameter untuk menentukan kesuburan jantan (Freund & Carrol 1964; Perreault & Cancel 2001). Pada tikus, kemampuan membuahi dari sperma dapat ditentukan dengan mengawinkan jantan dengan betina (kesuburan *in vivo*) dan mengamati kebuntingan yang dihasilkan dengan melakukan laparotomi. Namun demikian, pengujian kesuburan *in vivo* tidak spesifik untuk menentukan kemampuan membuahi dari sperma karena banyak faktor pada semen dan saluran genital betina yang turut berperan dalam kebuntingan (Das 1985; Quallich 2006). Oleh karena itu parameter yang lebih sesuai untuk menentukan kesuburan jantan adalah kualitas sperma. Kualitas sperma adalah parameter terpenting dan paling sering digunakan dalam menentukan kesuburan jantan (Freund & Carrol 1964; Perreault & Cancel 2001).

Analisis Kualitas Sperma

Kualitas sperma meliputi jumlah/bilangan/konsentrasi, motilitas, dan morfologi sperma. Analisis kualitas sperma merupakan salah satu metode yang ideal untuk menentukan kesuburan individu jantan. Pentingnya kualitas sperma dalam pembuahan menyebabkan pengujian laboratorium terhadap kualitas sperma menjadi penting untuk diagnosis ketidaksuburan jantan, dan pengujian ini dapat memberikan analisis objektif dan tepat tentang spermatogenesis sebagaimana pemeriksaan anatomi. Selain relatif mudah untuk dikerjakan, pengujian ini tidak mahal dan mudah diulang (Das, 1985; Kempinas & Lamano-Carvalho, 1988; Macpherson, 2001).

Namun demikian, sangat jarang training tentang analisis kualitas sperma, dan tanpa pendidikan yang mencukupi, sulit untuk meyakini hasil yang diperoleh dari analisis sperma. Beberapa asosiasi profesional di luar negeri menawarkan pelatihan, tetapi kebanyakan laboratorium tidak memiliki pendanaan yang mencukupi jika harus menambahkan biaya perjalanan. Namun demikian keterampilan dalam analisis kualitas sperma dapat diperoleh dengan latihan yang cukup berpandukan buku dan manual yang berkualitas (Rothmann & Reese, 2007).

Terdapat beberapa literatur tentang metode analisis kualitas sperma. Namun kebanyakan literatur tersebut tidak menjelaskan secara terperinci protokol analisis kualitas sperma. Selain itu terdapat variasi yang luar biasa dalam metode analisis kualitas sperma pada berbagai laboratorium. Hal ini disebabkan karena perbedaan dalam jenis hewan percobaan, fokus riset, literatur yang diacu, ketersediaan alat dan bahan, serta pengalaman dari masing-masing laboratorium. Buku ini bertujuan untuk mendeskripsikan metode analisis kualitas sperma meliputi penentuan jumlah sperma, motilitas sperma dan morfologi sperma tikus secara lengkap tahap demi tahap. Buku ini penting sebagai panduan, acuan atau rujukan bagi para mahasiswa, dosen dan peneliti di bidang biologi reproduksi terutama dalam analisis kualitas sperma. Buku ini akan memandu langkah-langkah analisis kualitas sperma sehingga diharapkan menghasilkan data yang valid, akurat dan konsisten.

BAB II

Sistem Reproduksi Jantan

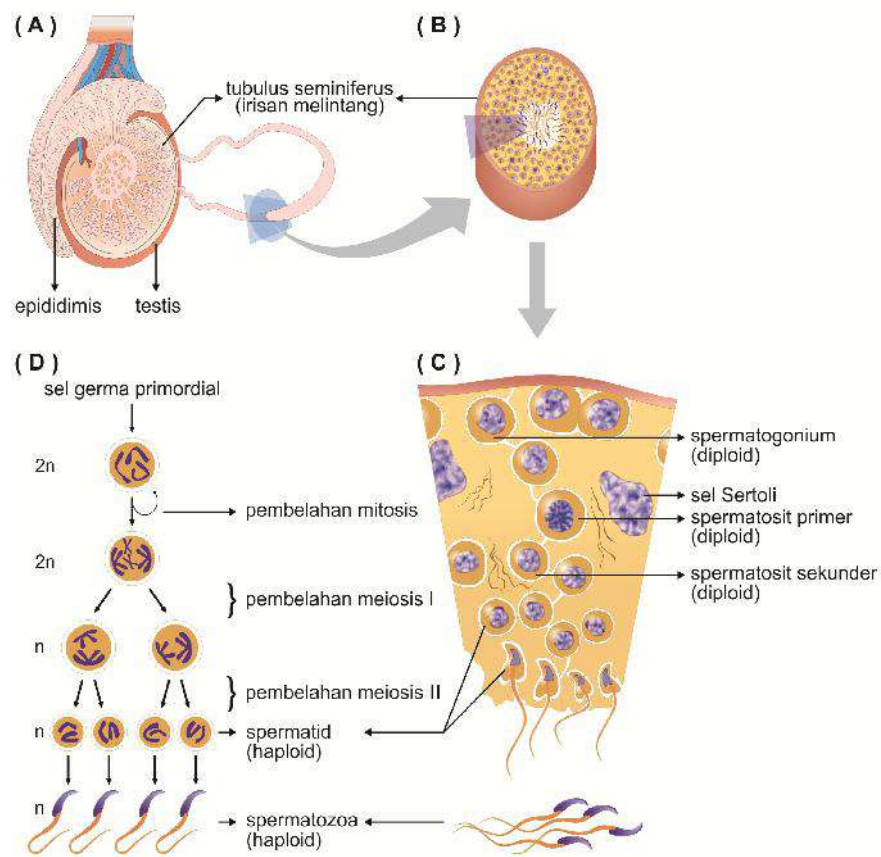
Jumlah sperma, kemampuan motilitas sperma, dan morfologi sperma merupakan hasil dari serangkaian proses yang saling terkait dalam sistem reproduksi jantan. Beberapa tahapan kompleks yang berurutan dari diferensiasi sel benih (sel germinal, *germcell*) dalam testis akan menghasilkan spermatozoa. Sperma kemudian masuk ke epididimis yang terbagi menjadi tiga segmen (kaput, korpus, dan kauda epididimis). Selain berfungsi sebagai tempat pematangan sperma, epididimis berfungsi dalam transportasi, proteksi dan penyimpanan sperma. Pematangan sperma dalam epididimis melibatkan berbagai perubahan morfologi dan biokimia, inisiasi motilitas, serta perolehan kemampuan membuahi. Bab ini akan membahas secara ringkas struktur dan fungsi testis, epididimis dan sperma.

Sistem reproduksi jantan terdiri dari sepasang testes dengan duktus ekskretori, kelenjar aksesori, dan penis. Duktus ekskretori terdiri dari epididimis, vas deferens, dan duktus ejakulatorius. Kelenjar aksesori terdiri dari sepasang vesikula seminalis, sepasang kelenjar bulbouretral, dan kelenjar prostat.

Testes

Testes (tunggal: testis) adalah sepasang organ yang menghasilkan sel-sel gamet jantan yaitu sperma, dan hormon seks jantan yaitu androgen. Setiap testis mempunyai fiber kapsul tebal yang dikenal sebagai tunika albuginea, yang menebal di bagian posterior membentuk mediastinum testis. Perluasan dari permukaan dalam kapsul ke mediastinum adalah suatu seri fiber septa yang membagi organ bagian dalam testis menjadi banyak lobul. Di dalam masing-masing lobul terdapat satu sehingga tiga gelung tubulus seminiferus. Setiap tubulus membentuk gelung yang berakhir dengan

tubulus lurus. Tubulus lurus masuk ke dalam rangkaian saluran dalam mediastinum testis yang dikenal sebagai rete testis (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Gambar skematik. (A) Testis, (B) Tubulus seminiferus, (C) Spermatogenesis. Testis (A) adalah tempat rangkaian tubulus seminiferus (B) yang merupakan tempat terjadinya spermatogenesis (D). Gamaaran terperinci dari tubulus seminiferus (C) yang ditunjuk dengan kotak (B) menunjukkan komposisi & susunan sel-sel benih pada fase yang berbeda.

Di dalam setiap lobul, di antara tubulus seminiferus, terdapat jaringan penghubung dan sekelompok sel-sel interstitial yang menghasilkan hormon seks jantan. Rete testis mempunyai saluran keluar yang dikenal sebagai duktus eferen, yang selanjutnya

membentuk duktus yang panjang yaitu epididimis (Junqueira & Carneiro 1988; Leeson & Leeson 1981).

Struktur testis dapat dibagi menjadi dua komponen utama yaitu jaringan intersel dan tubulus seminiferus. Jaringan intersel merupakan komponen endokrin utama yang terletak di antara tubulus seminiferus. Jaringan ini mengandung berbagai jenis sel, yang terpenting adalah sel-sel Leydig yang berupa sel-sel berbentuk bulat dan berukuran besar dengan sitoplasma yang bervakuola, kaya dengan tetes-tetes lipid, dengan nukleus yang besar, dan nukleoli yang jelas serta bergranula kasar (Hess 1998; Leeson & Leeson 1981). Hasil perembesan primernya adalah androgen. Androgen yang terpenting adalah testosteron. Fungsi utama hormon testosteron adalah untuk merangsang spermatogenesis. Hormon testosteron meningkatkan pertumbuhan tubulus seminiferus yang normal. Hormon ini juga penting untuk pertumbuhan dan perkembangan organ-organ seks (Turner & Bagnara 1976).

Tubulus seminiferus merupakan komponen terbesar yang menempati lebih dari 90% massa testis. Bagian ini bertanggung jawab terhadap penghasilan sperma (Leeson & Leeson 1981). Menurut Turner & Bagnara (1976), pada masa sebelum dewasa tubulus ini hanya mengandung spermatogonia, sel-sel Sertoli, serta sel-sel primordial yang belum berdiferensiasi. Pada masa akil baligh tubulus mempunyai lumen dan dibatasi oleh epitelium berlapis kompleks yang sangat tebal. Berdasarkan fungsinya, Leeson & Leeson (1981) membagi epitelium ini menjadi dua kelompok sel yang berbeda yaitu sel gamet jantan dan sel Sertoli.

Sel-sel gamet jantan dinamakan juga sebagai sel spermatogenik atau epitelium germinativum dan merupakan kelompok sel terbesar yang membentuk lapisan epitelium, dengan susunan 4-8 lapisan (Junqueira & Carneiro 1988). Melalui proses proliferasi dan diferensiasi yang sangat kompleks yang dikenali sebagai spermatogenesis, sel-sel ini mengalami perubahan struktur menjadi sperma. Pada irisan melintang tubulus, sel-sel ini jelas kelihatan berada dalam berbagai tingkat perkembangan dengan tingkat paling

awal terletak di basal, yaitu spermatogonia yang selanjutnya berkembang secara progresif menuju ke arah lumen membentuk spermatisit, kemudian spermatid, dan akhirnya menjadi sperma yang mengisi lumen tubulus (Hess 1998; Leeson & Leeson 1981).

Sel Sertoli merupakan sel-sel khusus yang terletak di antara sel spermatogenik. Sel Sertoli berbentuk piramid tinggi yang tidak teratur susunannya. Bentuk sel selalu berubah-ubah tergantung pada aktivitasnya. Sel ini masih dapat dibedakan dengan sel spermatogenik melalui kedudukan dan struktur nukleusnya yang besar, lonjong, serta mengandung banyak nukleoli (Hess 1998; Leeson & Leeson 1981). Menurut Junqueira dan Carneiro (1988) dan Leeson & Leeson (1981), fungsi sel ini antara lain adalah sebagai :

- a. penyokong, pelindung, pengatur nutrisi, dan perantara pertukaran bahan nutrien metabolit sperma yang sedang berkembang.
- b. pematangan sperma secara morfologi.
- c. perlindungan terhadap masuknya toksin dan bahan-bahan asing lainnya ke dalam tubulus.
- d. fagositosis sel-sel sperma yang mengalami degenerasi.
- e. fagositosis dan penyerapan sitoplasma yang berlebihan pada spermatid (badan residu).
- f. fagositosis lipid dari badan residu untuk biosintesis hormon steroid.
- g. perembesan cecair untuk media pengangkutan sperma.

Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah rangkaian peristiwa perubahan spermatogonia menjadi sperma. Secara umum, spermatogenesis terdiri dari dua proses utama yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis terdiri dari dua proses yaitu proses mitosis sel benih (spermatogonia) membentuk sel spermatisit dan proses meiosis yang mengurangi jumlah kromosom untuk membentuk spermatid. Spermatogonia adalah sel benih (sel

stem) yang terletak sepanjang membran dasar tubulus seminiferus. Spermatogonia membelah secara mitosis menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer kemudian migrasi melalui zona tengah epitelium seminiferus dan mengalami pembelahan mitosis (pembelahan mitosis yang pertama) menjadi spermatosit sekunder, masing-masing mengandung setengah dari jumlah kromosom sel primer. Spermatosit sekunder segera membelah (pembelahan mitosis yang kedua) membentuk sel terkecil yaitu spermatid, yang akan tertanam pada sisi sitoplasma sel sertoli. Spermatid selanjutnya akan mengalami seri perubahan morfologi menjadi sperma melalui proses spermiogenesis (Gambar 2.1.) (Leeson & Leeson 1981).

Spermiogenesis

Spermiogenesis adalah proses pembentukan sperma dari spermatid. Spermiogenesis terjadi dalam lumen tubulus seminiferus. Semasa spermiogenesis, spermatid bulat mengalami perubahan morfologi yang meliputi perkembangan flagela dan akrosom, pembentukan dan kondensasi nukleus, dan penyusutan/pengurangan sitoplasma (Leeson & Leeson 1981).

Flagela sperma sudah mulai berkembang dari awal spermiogenesis. Pada spermatid yang masih muda, pasangan sentriol berpindah ke permukaan sel dan salah satu dari kedua sentriol membentuk aksonema yang dengan cepat muncul dari sel. Pasangan sentriol membentuk aksonema kemudian berpindah kembali ke nukleus dan menyebabkan membran plasma terlekat ke sentriol. Seiring dengan pertumbuhan aksonema, komponen aksesori yaitu mitokondria, *outer dense fiber*, selubung fiber dan anulus ditambahkan ke flagela membentuk bagian tengah, bagian utama dan bagian ujung. Perkembangan flagela adalah proses yang terus-menerus sepanjang keseluruhan spermiogenesis (Austin 1968; Leeson & Leeson 1981).

Akrosom adalah struktur seperti tudung pada ujung anterior kepala sperma yang berfungsi melepaskan enzim digestif untuk membantu penembusan membran telur oleh sperma. Pada awal spermiogenesis, badan golgi menghasilkan vesikula kecil dan granula yang akhirnya bergabung menjadi vesikula besar berisi granula tunggal yang dikenal sebagai vesikula akrosom. Segera setelah melekat pada nukleus, vesikula akrosom bersatu dengan nukleus dan memipih menjadi tudung kecil yang menyelubungi permukaan nukleus. Seiring dengan perkembangan spermiogenesis, akrosom melebar hingga kira-kira 1/3 permukaan nukleus. Pada akhir spermiogenesis, akrosom berpindah ke bagian ventral nukleus yang memanjang, dan akrosom matang menutup hampir seluruh nukleus kecuali pada bagian yang berhubungan dengan flagela yang dikenal sebagai *post-nuclear cap* (Beagley et al. 1980; Leeson & Leeson 1981).

Sebelum sperma dilepaskan, sebagian besar sitoplasma disingkirkan menjadikan sperma lebih kecil dan *streamlined*. Proses penyingkiran ini terjadi dalam tiga tahap. Pertama, air disingkirkan dari nukleus dan sitoplasma semasa pemanjangan spermatid. Kedua, sebagian besar sitoplasma disingkirkan segera sebelum sperma dilepaskan. Ketiga, sisa sitoplasma yang dikenal sebagai badan residu dipisahkan dari spermatid pada masa pelepasan sperma ke dalam lumen. Sitoplasma yang disingkirkan difagositosis dan dicerna oleh sel-sel Sertoli, dan selanjutnya digunakan sebagai sumber tenaga. Setelah penyingkiran sitoplasma, sebagian kecil sitoplasma tersisa di sekitar leher spermatid yang dikenal sebagai droplet sitoplasma. Setelah sitoplasma disingkirkan, kepala sperma dilepaskan dari sitoplasma Sertoli. Akhirnya sperma dilepaskan ke lumen tubulus seminiferus (Austin 1968; Leeson & Leeson 1981).

Pematangan Epididimis

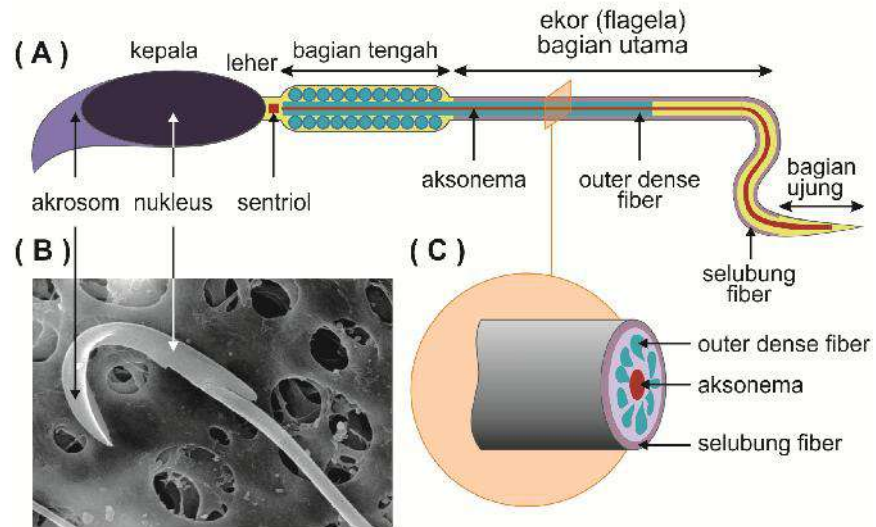
Setelah meninggalkan lumen tubulus seminiferus, sperma bergerak menuju ke rete testis, melalui duktus eferen dan tiba di epididimis. Sperma pada epididimis disimpan dalam tempo masa

tertentu di kauda epididimis untuk proses pematangan. Masa transit sperma pada epididimis berbeda-beda pada setiap spesies. Pada hamster, kelinci, tikus, dan manusia, rata-rata masa transit epididimis masing-masing ialah 10 hari, 8.9 hari, 8 hari dan 3.9 hari (Amann 1986).

Sperma yang dihasilkan di testis akan mengalami perubahan terus-menerus yang dikenal sebagai pematangan epididimis apabila melalui duktus epididimis untuk memperoleh kemampuan motilitas dan pembuahan. Secara histologi epididimis dapat dibagi menjadi tiga bagian utama yaitu kaput, korpus, dan kauda. Epididimis mamalia berperan penting dalam menyediakan keadaan yang spesifik intralumen supaya sperma dari testis yang belum matang akan menjalani proses pematangan yang melibatkan modifikasi morfologi dan biokimia semasa proses pematangan ini. Berbagai molekul intra-akrosom dan membran plasma sperma akan dimodifikasi karena keadaan demikian akan memungkinkan produksi sperma yang aktif bergerak (Jones 1998; Rajeev & Reddy 2004; Tulsiani et al. 1998).

Struktur Sperma

Sperma terdiri dari dua bagian utama yaitu kepala dan flagela (ekor). Pada bagian kepala sperma terdapat nukleus, akrosom dan membran plasma sperma. Secara struktur, flagela dibagi menjadi 4 bagian: bagian leher, bagian tengah, bagian utama dan bagian ujung. Leher melekatkan flagela pada kepala sperma.



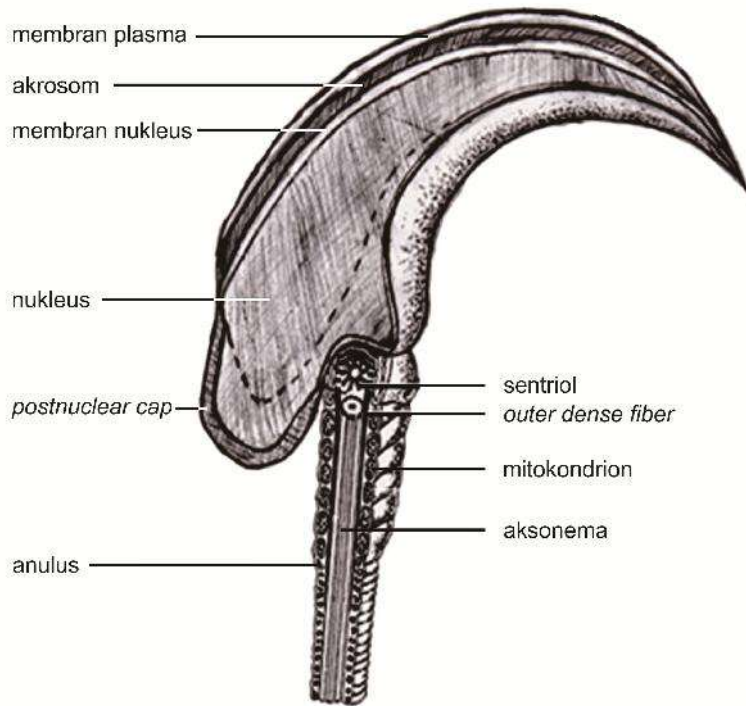
Gambar 2.2. Struktur sperma tikus. (A) Gambar skematik. (B) Gambar mikroskop elektron imbasan sperma *Rattus norvegicus*. (C) Skema irisan melintang bagian ekor.

Kepala Sperma

Kepala sperma dapat dibagi menjadi dua bagian utama, yaitu nukleus dan struktur membran. Nukleus mengandung kromosom haploid dan nukleoprotein. Struktur membran sperma terdiri dari (1) membran plasma yang menutup seluruh permukaan kepala sperma; (2) akrosom, yaitu struktur di sebelah dalam membran plasma yang menutup bagian anterior nukleus; dan (3) *Postnuclear cap*, yaitu selubung sitoplasma yang menutup bagian posterior akrosom (Gambar 2.3.).

Akrosom yang mengandung enzim pada kepala sperma penting untuk proses penembusan sel telur. Sperma yang diejakulasi harus mengalami proses kapasitasi supaya dapat membuahi oosit. Kapasitasi ialah proses yang menyebabkan perubahan fisiologi pada membran plasma kepala sperma sebelum mengalami reaksi akrosom. Proses ini melibatkan penyingkiran protein dan

glikoprotein plasma semen yang melekat pada permukaan sperma, dan selanjutnya terjadi rangkaian perubahan biokimia dan fisiologi pada sperma (Guan 2009).



Gambar 2.3. Lukisan skematik kepala sperma tikus.

Flagela (ekor) Sperma

Flagela ialah bagian yang bertanggung jawab dalam motilitas dan kemampuan membuahi dari sperma (Cao et al. 2006a). Flagela dibagi menjadi 4 bagian: bagian leher, bagian tengah, bagian utama dan bagian ujung. Inti flagela adalah struktur mikrotubul yang dikenali sebagai aksonema yang memanjang dari bagian penghubung hingga bagian akhir flagela. Aksonema dikelilingi oleh sembilan *outer dense fiber* (ODF) (Gambar 2.2.) (Guan 2009; Yang et al. 2005). ODF berfungsi menyediakan struktur sokongan untuk ekor sperma yang panjang.

Pada flagela terdapat enzim-enzim yang berperan penting dalam produksi tenaga sperma yang diperlukan untuk motilitas sperma dan pembuahan. Enzim-enzim tersebut merupakan enzim yang terlibat dalam glikolisis dan fosforilasi oksidatif. Kedua proses tersebut merupakan sumber penghasilan tenaga pada sperma. Di antara enzim yang terlibat dalam glikolisis ialah enolase, fosfoglisarat kinase 2, dan laktat dehidrogenase, sedangkan enzim yang terlibat dalam oksidasi fosforilatif ialah ATP sintase. enolase, fosfoglisarat kinase 2, dan laktat dehidrogenase terdapat pada selubung fiber, sedangkan ATP sintase terdapat pada mitokondria yang terletak dalam selubung mitokondria (Ford 2006; Turner 2003).

Bagian utama flagela, yang mencakup kira-kira dua pertiga panjang flagela, diselubungi oleh selubung fiber (Austin 1968). Selubung fiber diyakini berperan dalam tindakan mekanik motilitas sperma dengan menyediakan sokongan flagela dalam mempengaruhi bentuk dan ayunannya. Protein yang berhubungan dengan selubung fiber telah diidentifikasi dan dikategorikan dalam dua kelompok utama: *cAMP-dependent protein kinase anchoring protein* (AKAP), dan enzim glikolisis. AKAP, termasuk AKAP4 yang merupakan komponen utama selubung/ fiber, berfungsi sebagai kerangka untuk komponen isyarat yang mengatur motilitas sperma. Enzim glikolisis, meliputi laktat dehidrogenase, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* and *hexokinase 1*, bertanggung jawab untuk produksi ATP yang diperlukan untuk motilitas hiperaktif sperma (Austin & Short 1978; Guan 2009; Johnson & Everift 1984).

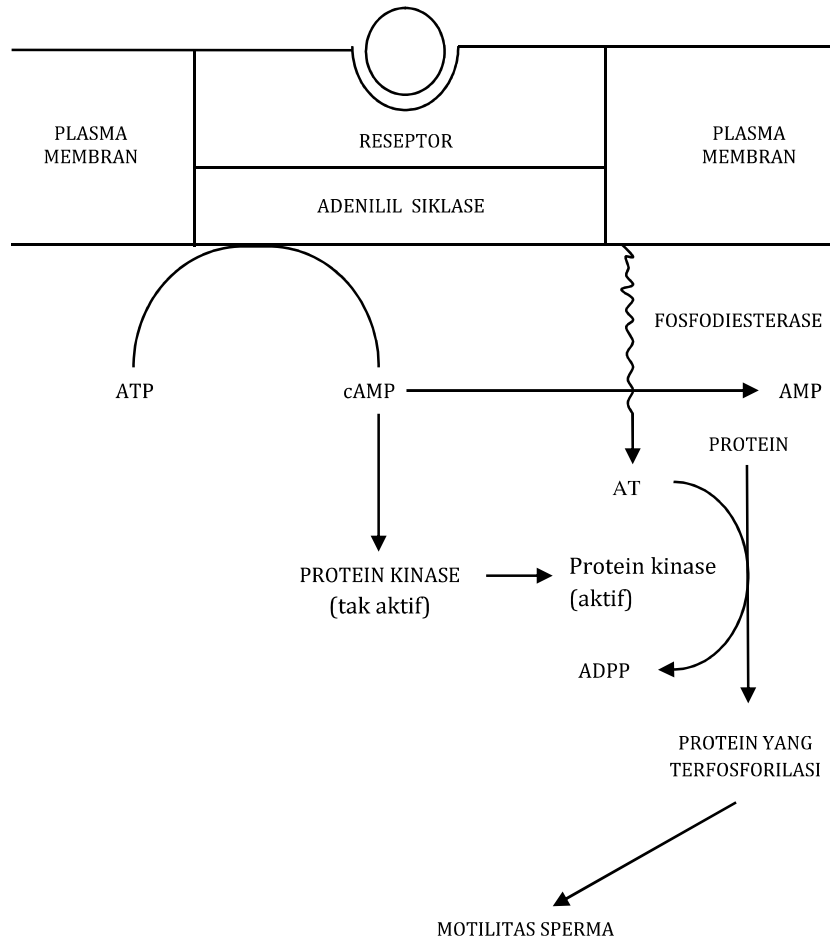
Metabolisme Tenaga pada Sperma

Sumber tenaga pada sperma ialah ATP. ATP terutama digunakan untuk motilitas sperma (Gambar 2.4) (Maynard et al. 1979). Berbanding sel somatik lain, sperma memerlukan lebih banyak ATP untuk menyediakan tenaga bagi pergerakan sperma, kapasitasi, dan proses pembuahan. Sperma menggunakan kedua jalur yaitu glikolisis dan fosforilasi oksidatif untuk produksi ATP (Gitlits et al, 2000).

Terdapat tiga siklus utama yang dilalui dalam penghasilan ATP: glikolisis (Embden-Meyerhof), asam trikarboksilat (Krebs) dan fosforilasi oksidatif. Dengan istilah paling sederhana, suatu senyawa seperti glukosa memasuki siklus glikolisis, selanjutnya melalui siklus Krebs dan akhirnya memasuki urutan fosforilasi oksidatif. Dalam perjalanannya, ATP dihasilkan, CO₂ dilepaskan, dan terbentuk H₂O (Maynard et al. 1979).

Yamashiro et al (2009) menyatakan bahwa mitokondria merupakan tempat produksi tenaga untuk motilitas ekor sperma. Tenaga dapat diperoleh dari substrat eksogen atau endogen baik melalui jalur aerobik atau anaerobik. Sperma juga diyakini mampu melakukan aktivitas anabolik yang terbatas (penggabungan asam amino atau sintesis lemak). Namun demikian proses metabolik ini tidak hanya terjadi pada mitokondria. Beberapa enzim dan sistem oksidatif pada selubung fiber ekor sperma menunjukkan adanya aktivitas metabolisme di luar mitokondria.

Reaksi metabolik utama pada sperma mamalia melibatkan jalur penggunaan monosakarida sederhana untuk membentuk tenaga kimia untuk menghasilkan mekanisme motilitas dan memelihara keseimbangan osmosis sel. Glukosa dan fruktosa ialah sumber utama bahan metabolik pada sperma kebanyakan spesies, walaupun manosa dan mungkin juga galaktosa juga digunakan. Kemungkinan, glukosa merupakan sumber paling penting untuk tenaga sperma mamalia. Pengangkutan glukosa ke sperma merupakan langkah pertama dalam metabolisme.



Gambar 2.4. Peranan ATP dalam motilitas sperma (Zanefeld & Chatterton 1982).

Pengaruh Suatu Bahan Terhadap Sistem Reproduksi

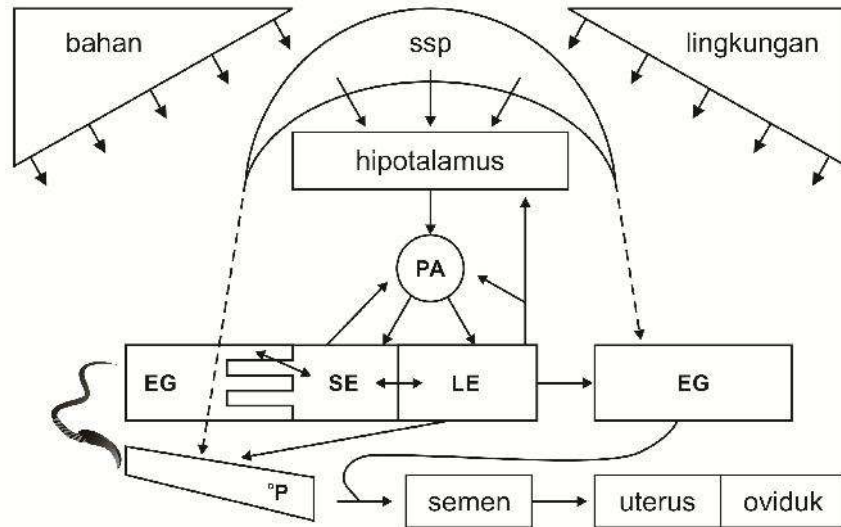
Fungsi normal sistem reproduksi memerlukan komunikasi antara sistem saraf pusat dan hipotalamus atau organ-organ reproduksi. Isyarat hormonal dan neurokimia memberikan informasi antara hipotalamus, kelenjar pituitari anterior, sel-sel Leydig, sel-sel Sertoli, dan epitelium germinal. Oleh karena itu, fungsi kesuburan dapat terganggu karena perubahan pada organ-organ tersebut (Amann 1986).

Menurut Turner & Bagnara (1976), secara umum fungsi normal testis dipengaruhi oleh dua faktor utama, yaitu: faktor internal (suhu tubuh dan pengaturan oleh sistem hipotalamus-hipofisis) dan faktor eksternal (faktor psikologi, masa pencahayaan, suhu lingkungan, nutrisi, bahan-bahan kimia tertentu, dan hubungan sosial).

Nutrisi dan pengambilan bahan-bahan tertentu sangat berpengaruh terhadap fungsi normal testis dalam menghasilkan sperma dan hormon jantan yang digunakan untuk pemeliharaan sistem maupun aktivitas reproduksi. Makanan maupun bahan-bahan tersebut bertindak sebagai perangsang yang spesifik terhadap fungsi testis baik secara langsung atau secara tidak langsung melalui pengaturan sistem hipotalamus-hipofisis. Menurut Zenick & Clegg (1989), suatu bahan mempengaruhi spermatogenesis dengan dua cara, yaitu: (1) mempengaruhi proliferasi sel-sel gamet sebagai pengaruh langsung, dan (2) memberikan berbagai reaksi terhadap gonadotropin sebagai pengaruh tidak langsung terhadap sel-sel dari organ-organ sasaran.

Suatu agen (bahan) yang bertindak secara langsung pada otak, hipotalamus, atau kelenjar pituitari anterior secara tidak langsung mempengaruhi testis atau mungkin juga perilaku seksual. Efek neural mungkin juga mempengaruhi pengangkutan sperma melalui epididimis atau ejakulasi. Suatu bahan yang bertindak pada testes secara tidak langsung mempengaruhi epididimis, kelenjar seks asesori, hipotalamus dan kelenjar pituitari anterior. Suatu agen yang bertindak secara langsung pada epididimis atau cairan epididimis akan mempengaruhi sperma, tetapi mungkin tidak mempengaruhi komponen lain dari sistem reproduksi. Demikian juga bahan yang mempengaruhi kelenjar seks asesori atau seminal plasma dapat mempengaruhi fungsi sperma tetapi mungkin tidak mempengaruhi fungsi aspek-aspek lain dari sistem reproduksi (Ariens et al. 1986; Clegg et al. 2001).

Suatu bahan, atau metabolitnya, yang diberikan kepada hewan akan didistribusikan ke kebanyakan komponen sistem reproduksi jantan melalui darah dan cairan tubuh. Namun demikian, tubulus seminiferus mempunyai *blood-testis barrier*. *Tight junction* antara sel-sel Sertoli yang bersebelahan membagi epitelium germinal menjadi dua ruang fungsional yaitu ruang basal dan ruang adluminal. Ruang basal mengandung semua spermatogonia seperti preleptotene dan spermatosit leptotene awal. Kebanyakan bahan mungkin mempunyai jalan masuk tidak terbatas ke kompartemen basal. Ruang adluminal mengandung spermatosit primer, semua spermatosit sekunder, dan semua spermatid. Oleh karena itu, sebagian besar meiosis dan perubahan morfologi spermatid, terjadi dalam ruang adluminal dimana lingkungan sekeliling sel germinal jenis tertentu dikontrol oleh sel-sel Sertoli. Kecuali untuk agen yang menyebabkan kerusakan sekatan darah-testis, jalan masuk ke ruang adluminal dikontrol oleh sel-sel Sertoli. Pada epididimis, *junctional complexes* sel-sel utama dari epitelium yang melapisi duktus, membentuk *blood-testis barrier* yang juga membatasi masuknya molekul ke lumen duktus epididimis. Namun demikian, terdapat bukti bahwa banyak agen masuk dengan cepat dari darah ke plasma epididimis dan oleh karena itu dapat mempengaruhi fungsi epididimis. Dengan cara yang serupa kelenjar seks aksesori dapat bertindak sebagai titik perpindahan untuk bahan/agen dari darah ke seminal plasma yang selanjutnya dapat mempengaruhi fungsi sperma (Amann 1986).



Gambar 2.5. Pengaruh suatu bahan terhadap komponen-komponen yang saling bergantung pada sistem reproduksi jantan. ssp, sistem saraf pusat; EG, epitelium germinativum; SE, sel Sertoli; LE, sel Leydig; ep, epididimis; PA, kelenjar pituitari anterior (Amann 1986).

BAB III

Teknik Preparasi Sampel Sperma

Pendahuluan

Standar pengujian toksikologi atau bioaktivitas suatu bahan terhadap sperma adalah menggunakan tikus. Namun demikian hingga sekarang untuk rodensia tidak tersedia metode yang memuaskan dalam pengambilan sampel sperma pada hewan hidup. Oleh karena itu perlu dilakukan pengambilan sampel terminal (sampel diambil setelah tikus dikorbankan terlebih dulu).

Spesies

Metode yang digunakan dalam buku ini adalah metode untuk tikus (*Rattus norvegicus*) saja. Modifikasi & berbagai pertimbangan perlu diperhatikan untuk penggunaan metode ini pada mencit, hamster, dan kelinci.

Umur Hewan

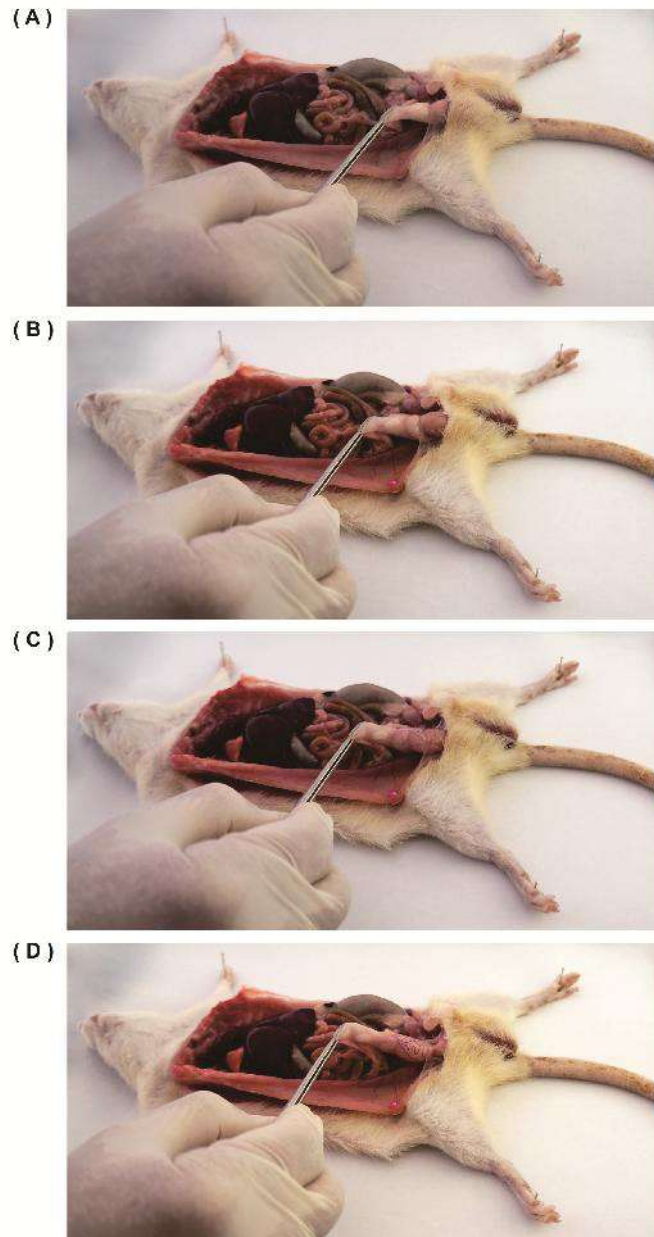
Idealnya hewan sudah matang secara seksual pada saat dikorbankan untuk pengambilan sampel. Ada perbedaan kematangan seksual pada berbagai strain tikus. Namun demikian sebagian besar strain tikus matang secara seksual pada umur 12-14 minggu.

Metode post mortem

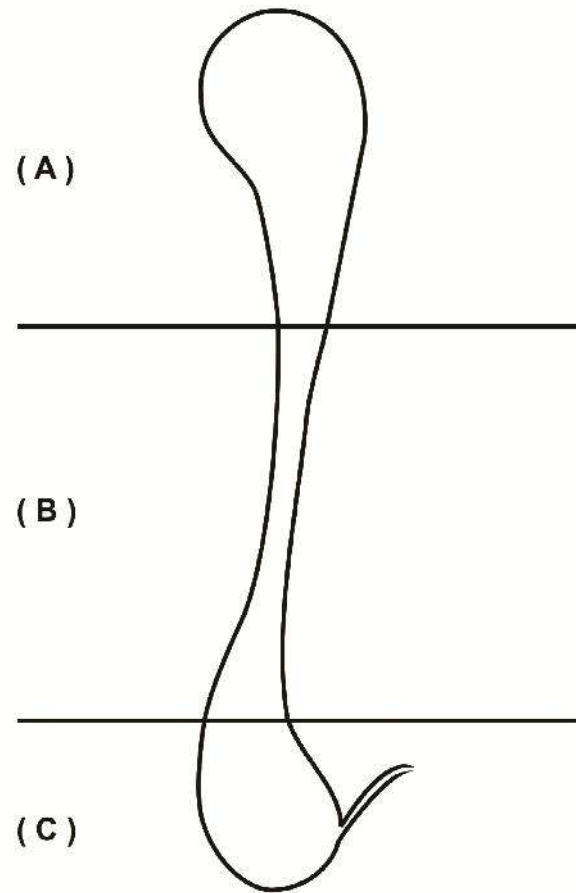
Tikus dikorbankan menggunakan teknik *cervical dislocation*. Penggunaan kloroform kurang dianjurkan karena kemungkinan dapat mempengaruhi kualitas sampel yang diperoleh. Namun demikian apapun metodenya, semua sampel harus diambil segera setelah tikus mati.

Sampling

Tikus dibedah kemudian diambil epididimisnya dengan cara menarik *spermatic cord* pada bagian kranial testis sehingga testis keluar dari skrotum (gambar 3.1). Kemudian epididimis dipisahkan dari testis. Kauda Epididimis kanan dari tikus jantan digunakan untuk analisis jumlah sperma. Kauda Epididimis kiri digunakan untuk analisis motilitas & morfologi sperma. Kauda epididimis diambil berdasarkan pembagian epididimis yang ditentukan oleh Hamilton (1975) (gambar 3.2).



Gambar 3.1. Teknik pengambilan testis tikus untuk diambil epididimisnya. (A) - (D) Urutan-urutan penarikan *spermatic cord* testis sehingga testis keluar dari skrotum.



Gambar 3.2. Diagram skematik epididimis tikus. (A) kaput; (B) korpus; (C) kauda yang terbagi menjadi proksimal dan distal epididimis kauda (Hamilton 1975).

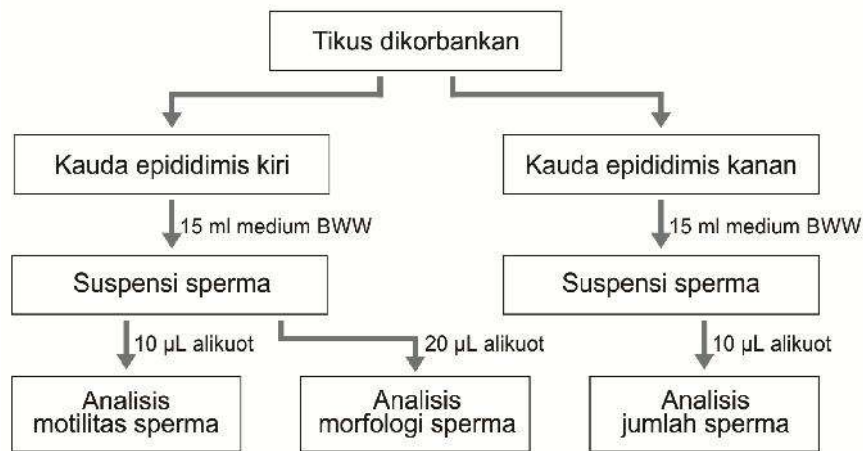
Medium

Medium fisiologi sebaiknya digunakan untuk menghindari distorsi sperma. Medium yang dianjurkan adalah BWW. Jika hanya morfologi sperma yang akan diuji, larutan garam fisiologi sudah mencukupi.

Pembuatan Suspensi Sperma

Jumlah sperma dari hewan percobaan dapat ditentukan dari sampel ejakulat, epididimis, atau testis. Pengujian pada metode ini adalah menggunakan sperma dari bagian kauda epididimis. Penghitungan sperma dari kauda epididimis adalah metode yang paling umum digunakan (Clegg et al., 2001). Kauda epididimis kanan digunakan untuk penghitungan jumlah sperma, sedangkan kauda epididimis kiri digunakan untuk penentuan motilitas dan morfologi sperma.

Kauda epididimis dipisahkan berdasarkan pembagian epididimis yang ditentukan oleh Hamilton (1975), kemudian kauda epididimis dipotong berulang kali dan diinkubasi dalam 15 mL larutan media Biggers, Whitten, &Whittingham (BWW) (Biggers et al. 1971) selama 30 menit pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO₂ untuk membiarkan sperma berenang dalam media BWW (teknik *swimp up*).



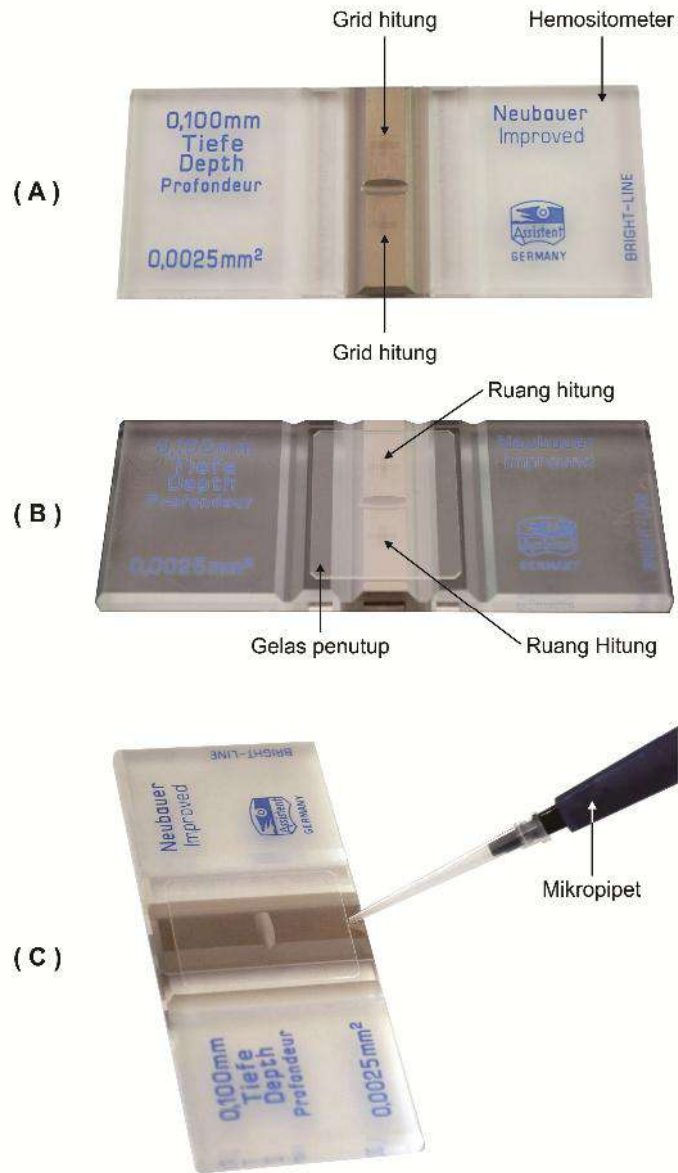
Gambar 3.3. Pembagian epididimis untuk analisis kualitas sperma

BAB IV

Jumlah Sperma

Penghitungan jumlah sperma epididimis umumnya digunakan pada kajian toksikologi untuk menilai kerusakan pada sistem reproduksi jantan, ataupun untuk mengetahui ada tidaknya potensi bioaktivitas suatu bahan dalam peningkatan jumlah sperma. Pengurangan bilangan sperma epididimis menandakan pengurangan pada produksi harian sperma oleh testis, rintangan pengangkutan dari testis ke epididimis, atau perubahan waktu transit epididimis dari sperma. Perbandingan perubahan bilangan sperma setelah perlakuan dengan suatu bahan atau obat dapat memberikan petunjuk penting mengenai efek suatu bahan terhadap produksi sperma (Working, 1988).

Pada umumnya penghitungan jumlah sperma epididimis dilakukan menggunakan hemasitometer (Strader *et al.*, 1996). Hemasitometer adalah suatu gelas slide khusus yang digaris secara akurat, menghasilkan goresan grid dengan dimensi akurat. Hemasitometer menggunakan gelas penutup khusus yang cukup tebal supaya tetap datar dalam menahan tegangan permukaan dari cairan pada ruang hitung. Awalnya alat ini dikembangkan untuk menghitung sel darah, seperti tercermin dari namanya. Namun pada perkembangannya dapat digunakan untuk menghitung sel termasuk juga sel sperma. Ada beberapa tipe hemasitometer, salah satu yang paling sering dipakai adalah Improved Neubauer. Tipe ini memiliki dua ruang hitung. Di dalam masing-masing ruang hitung terdapat satu grid hitung. Grid hitung terdiri dari area sentral yang berukuran 1 mmx 1 mm, yang dibagi menjadi 25 kotak besar. Masing masing kotak besar dibatasi oleh garis rangkap tiga dan terdiri dari 16 kotak kecil.



Gambar 4.1. Foto slide hemositometer (*Improved Neubauer*). (A) Tampak atas. (B) Slide hemositometer yang sudah dipasang gelas penutup. (C) Aplikasi sampel ke ruang hitung.

Penentuan konsentrasi sperma dengan hemositometer adalah dasar utama untuk menentukan apakah suatu sampel normal dan untuk meramalkan apakah suatu individu subur. Penghitungan dengan hemositometer menjadi metode standar untuk pengukuran jumlah sperma (Freud & Carol, 1964). Dibandingkan dengan metode lain, hemositometer masih merupakan metode yang lebih baik untuk penghitungan jumlah sperma (Kuster, 2005). CASA (*Computer Aided Sperm Analysis*) dan IVOS (*Integrated Visual Optical System*) merupakan metode otomatis pengujian kualitas sperma. Namun demikian CASA dan IVOS dioptimasi untuk penghitungan jumlah sperma manusia, yang mana bentuk kepala sperma manusia berbeda dengan kepala sperma tikus. Kepala sperma manusia berbentuk bulat sedangkan kepala sperma tikus berbentuk kait. Selain itu ukuran kepala sperma manusia relatif lebih kecil dibandingkan ukuran kepala sperma tikus. Oleh karena itu, penghitungan jumlah sperma tikus dengan menggunakan CASA tidak terlalu sesuai (Das 1985; Kuster 2005; Strader 1996). Selain itu CASA sangatlah mahal dan memerlukan investasi besar dari segi waktu untuk mempelajari dan mengoperasikannya (Rothmann & Reese, 2007).

Prinsip

Menghitung sperma yang telah menetap pada hemositometer adalah pekerjaan yang tidak sukar. Permasalahan adalah menjamin bahwa sperma yang dihitung dan suspensi sampel mewakili keseluruhan suspensi sperma. Ini memerlukan konsistensi dalam pemisahan kauda epididimis, volume medium yang sesuai, homogenitas suspensi sperma, dan konsistensi dalam setiap langkah penghitungan.

Sperma dihitung dengan menggunakan *improved Neubauer Haemocytometer* mengikuti metode Prasad *et al.* (1972) dan Kvist & Bjorndahl (2002) dengan modifikasi (Luthfi, 2010). Sperma pada 25 kotak besar dari setiap ruang hitung dalam hemositometer dihitung melalui pengamatan menggunakan mikroskop pada perbesaran 200x.

Untuk memperoleh volume yang tepat pada ruang penghitungan (*counting chamber*), gelas penutup harus diletakkan secara tepat (erat) dan ruang harus diisi secara betul. Konsentrasi sperma ($10^6/\text{ml}$) ditentukan dengan membagi jumlah sperma yang dihitung pada grid hitung ruang penghitungan dengan volume kotak dimana sperma dihitung. Jumlah sperma per kauda epididimis ($10^6/\text{kauda epididimis}$) adalah hasil dari konsentrasi sperma dikalikan dengan volume medium BWW yang digunakan.

Protokol

1. Bersihkan permukaan slide hemasitometer dengan alkohol 70%, lakukan dengan hati-hati agar tidak menggores permukaan grid hitung. Bersihkan gelas penutup dan sedikit basahkan kelilingnya. Gunakan selalu gelas penutup yang khusus untuk hemasitometer (biasanya dijual satu paket dengan hemasitometernya). Gelas penutup biasa yang digunakan untuk preparasi histologi tidak akan memberikan hasil yang akurat.
2. Lekatkan gelas penutup pada ruang hitung (*Improved Neubauer haemocytometer*), tekan kebawah. Gunakan kedua ibu jari untuk menekan, masing-masing pada tepi gelas penutup pada bagian yang ditopang oleh penyangga gelas penutup. Kenampakan pola interferensi ("*newton's rings*" / "*iridescence lines*" -warna2 pelangi antara gelas penutup dan slide seperti yang terbentuk oleh oli pada air) mengindikasikan bahwa gelas penutup telah melekat secara tepat. Kenampakan garis-garis (*newton's rings*) yang terlalu sedikit (kurang dari 10) menunjukkan bahwa jarak antara gelas penutup dan slide hemasitometer melebar, oleh karena itu volume ruang hitung menjadi lebih besar dan hasil pengujian menjadi tidak tepat.

3. Sebanyak 10 μL suspensi sperma yang akan dihitung diambil dengan mikropipet dari penyediaan sperma (rujuk Bab III). Pegang mikropipet dengan satu tangan dan gunakan sisi atas dari jari kelingking tangan yang lainnya untuk memandu tip mikropipet. Mikropipet sebaiknya membentuk sudut 45° dengan ruang hitung. Sentuhkan ujung mikropipet pada permukaan ruang hitung yang berhimpitan dengan gelas penutup. Sisipkan sampel ke dalam ruang di antara gelas penutup dan slide hemositometer pada salah satu ruang hitung hemositometer. Suspensi disisipkan secara perlahan-lahan, biarkan suspensi mengalir keluar dari pipet dan tersebar ke bawah gelas penutup oleh gaya kapiler. Isi ulang pipet dan sisipkan sampel dengan cara sama ke ruang hitung yang satunya. Jangan mengisi kedua ruang hitung dengan satu kali pengambilan sampel. Masing-masing ruang hitung harus diisi secara sempurna. Jika pengisian ruang hitung tidak sempurna (tidak merata), harus diulang lagi pengisian sampelnya. Pembuangan volume yang berlebihan dari ruang hitung tidak boleh dilakukan karena akan mengubah konsentrasi sperma pada ruang hitung. Catatan: konsistensi dalam teknik pengisian sampel adalah kunci dalam keakuratan penghitungan (berlatihlah dulu dengan sampel untuk latihan sebelum bekerja dengan sampel yang sebenarnya!).
4. Letakkan slide hemositometer pada mikroskop. Biarkan selama 10 menit agar sperma terserak dan menetap pada ruang hitung.
5. Nyalakan lampu mikroskop, pilih perbesaran 10x objektif dan fokuskan pada garis grid hitung dari ruang hitung. Jika pemfokusan susah, karena kontras minim, tutup bidang iris atau buat pencahayaan agak miring dengan memiringkan cermin atau seimbangkan kondenser. Penggunaan mikroskop fase kontras lebih dianjurkan karena sperma akan terlihat lebih jelas.

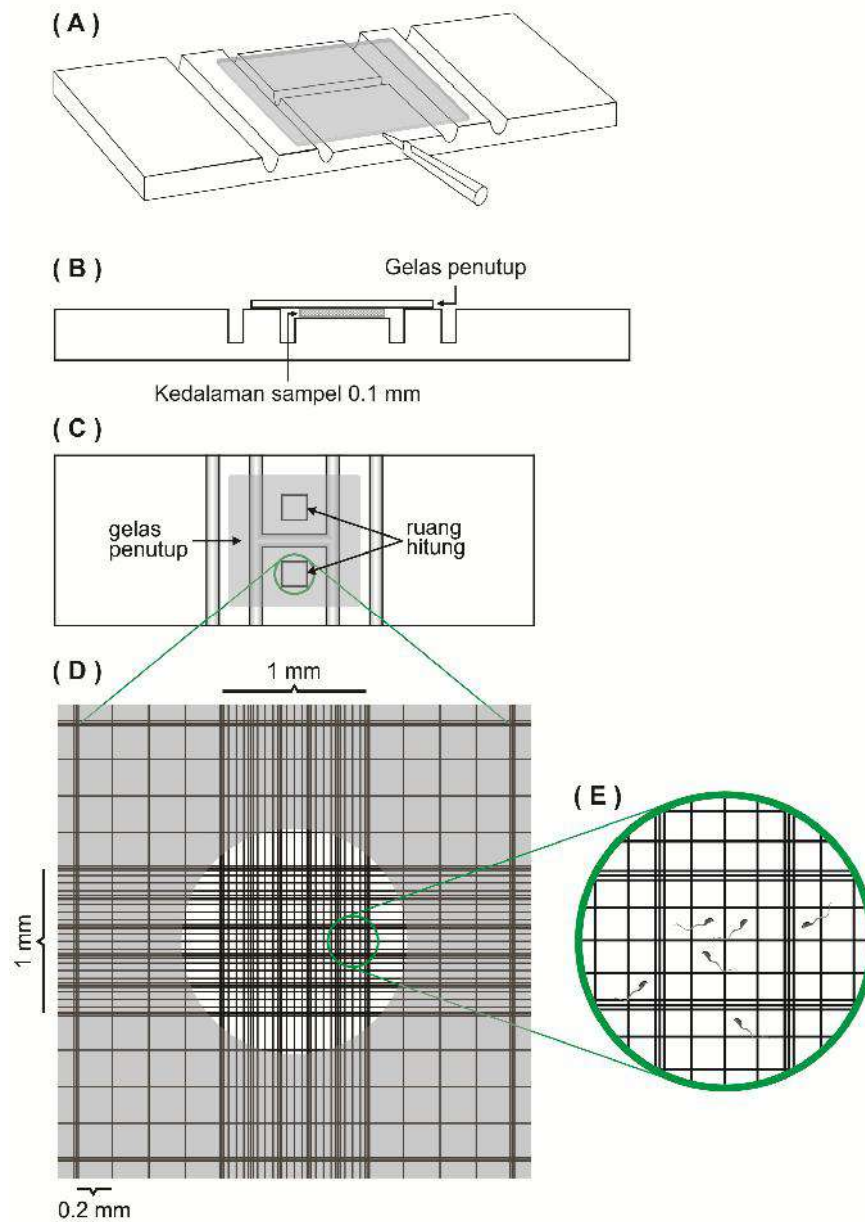
6. Gerakkan/posisikan slide sehingga bidang yang terlihat adalah area sentral dari grid hitung. Area sentral ini berukuran 1mmx 1mm dan kedalaman 0.1 mm (100 μm). Oleh karena itu volume keseluruhan pada area ini adalah $0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \mu\text{L} = 100 \text{ nL}$ dengan menggunakan lensa obyektif 10x, area ini mengisi hampir keseluruhan bidang pandang mikroskop. Bergantung bidang pandangnya, dimungkinkan sudut-sudut area sentral akan sedikit diluar bidang. Area sentral dari grid hitung terdiri dari 25 kotak besar (Gambar 4.2. & Gambar 4.3.). Setiap sisi masing-masing kotak besar tersebut dibatasi/dikelilingi oleh garis triplet. Di dalam satu kotak besar terdapat 16 kotak kecil. Oleh karena itu keseluruhan kotak kecil di area sentral adalah $16 \times 25 = 400$ kotak kecil. kotak kecil memudahkan penghitungan jika terlalu banyak sperma terdapat pada kotak besar. Hitung semua sperma yang terdapat pada area sentral dari grid hitung (25 kotak besar) tersebut (Gambar 4.2.).

7. Hitung sperma dengan perbesaran 100 atau 200x mengikuti kriteria berikut ini:
 - a. Penghitungan dilakukan pada ke semua 25 kotak besar (area sentral grid hitung) pada masing-masing ruang hitung. Gunakan *hand counter* untuk melakukan penghitungan. Penghitungan dilakukan berurutan dari kotak besar paling kiri atas, diteruskan pada kotak di sebelah kanannya, kemudian setelah kotak paling kanan atas dihitung, diteruskan ke kotak di bawahnya, kemudian kotak disebelah kirinya, begitu seterusnya. Jika sperma terlalu padat, gunakan kotak kecil sebagai panduan untuk menghitung. Lakukan dengan cara yang sama seperti penggunaan kotak besar, yaitu dari kotak paling kiri ke kanan, kemudian setelah kotak paling kanan, hitung kotak di bawahnya, begitu seterusnya (Gambar 4.4.).
 - b. Sperma yang dihitung adalah kepala spermanya, jika terdapat kepala sperma tanpa ekor juga dihitung.

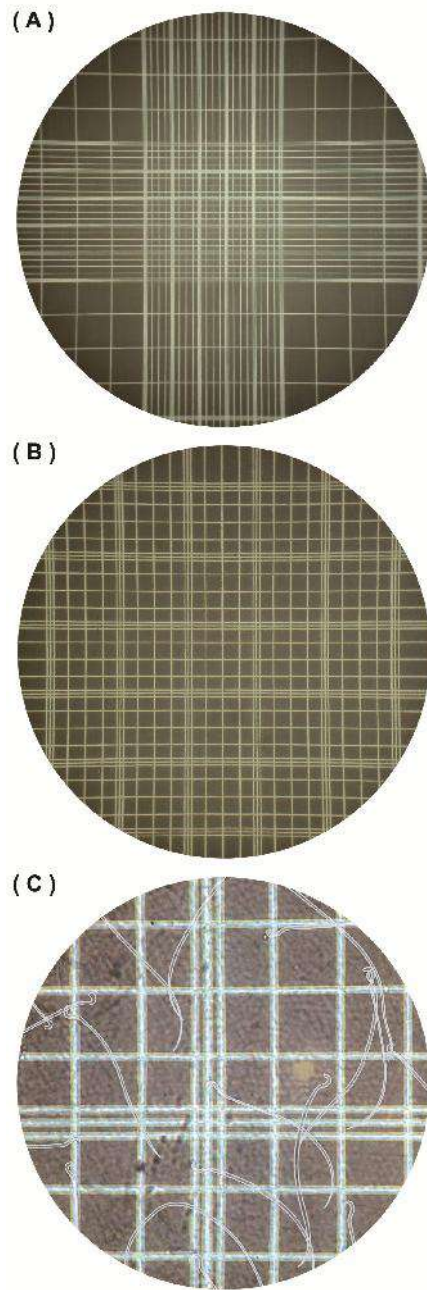
- c. Untuk sperma yang terletak di perbatasan kotak besar (garis triplet): hanya sperma yang kepalanya terletak pada garis triplet atas dan garis triplet kiri yang dihitung sebagai milik dari kotak tersebut. Jangan menghitung sperma yang terletak pada garis triplet bawah dan garis triplet kanan. Hal ini dilakukan untuk menghindarkan agar suatu sperma tidak dihitung dua kali (Gambar 4.4.).
- d. Hasil penghitungan pada masing-masing ruang hitung idealnya mencapai 200-300 sperma untuk memperkecil deviasi. Jika sperma yang diperoleh dari penghitungan pada satu ruang hitung kurang dari 150, maka harus dibuat sampel suspensi sperma yang baru dengan mengurangi volume medium BWW. Jika hasil penghitungan melebihi 400, buat sampel suspensi sperma yang baru dengan menambah volume medium BWW.

Hasil

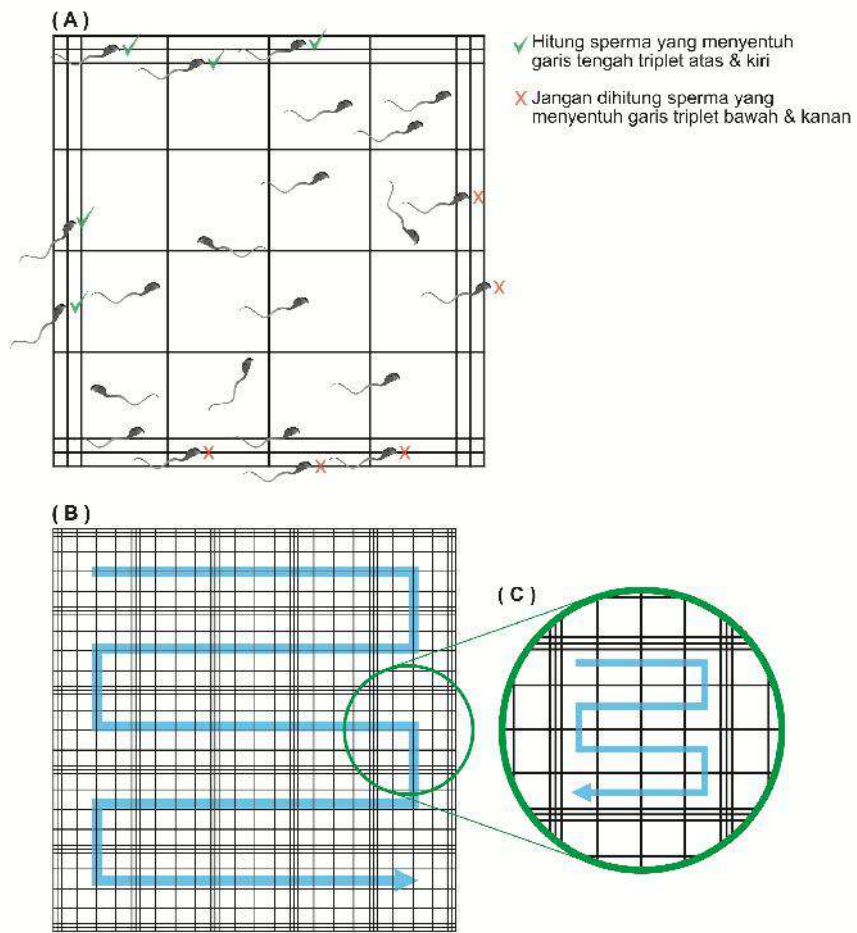
Konsentrasi sperma dan total sperma per kauda epididimis dicatat dalam formulir record sampel.



Gambar 4.2. Diagram skematik hemasitometer dan grid hitungnya. (A) Aplikasi sampel pada ruang hitung. (B) Irisan longitudinal dari slide menunjukkan sampel sperma pada ruang dengan kedalaman 0,1 mm. (C) Tampak atas. (D) Total area grid hitung. Area yang terang adalah area sentral yang terlihat dengan perbesaran 10x objektif. Area sentral dari grid hitung ini adalah seluas 1mm persegi. (E) Salah satu dari 25 kotak besar.



Gambar 4.3. Bidang pandang grid hitung pada hemasitometer dengan perbesaran (A) 4x obyektif, (B) 10x obyektif, (C) sperma tikus pada perbesaran 40x obyektif.



Gambar 4.4. Cara & urutan penghitungan. (A) Cara penghitungan pada garis batas kotak besar (gars triplet). (B) Urutan penghitungan pada area sentral. (C) urutan penghitungan pada kotak kecil dan salah satu kotak besar.

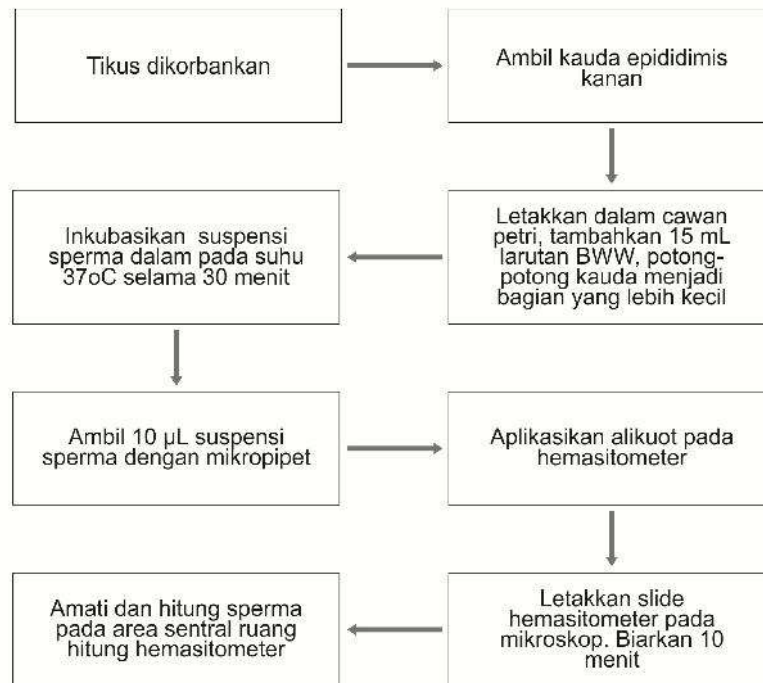
Penghitungan Bilangan Sperma per Kauda Epididimis

Ada tiga tahap kalkulasi untuk mendapatkan jumlah sperma per kauda epididimis.

1. Pertama, hitung rata-rata sperma yang dari dua ruang hitung dengan cara menjumlahkan hasil penghitungan yang didapat dari masing-masing ruang hitung tersebut kemudian hasilnya dibagi.
2. Kedua, tentukan konsentrasi sperma pada ruang hitung. Volume satu kotak besar pada hemasitometer adalah 4 nL ($200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$). Jadi volume dari 25 kotak besar adalah $25 \times 4\ \text{nL} = 100\ \text{nL}$. Oleh karena itu konsentrasi sperma adalah rata-rata jumlah sperma (dari kedua ruang hitung) dibagi dengan volume tersebut. Konsentrasi sperma yang diperoleh adalah jumlah sperma per nL, yang sama dengan juta sperma /mL ($\text{sperma}/10^{-9}\ \text{L} = \text{sperma} \times 10^6/10^{-3}\ \text{L}$).
3. Ketiga, untuk memperoleh jumlah sperma per kauda epididimis, konsentrasi sperma yang diperoleh dikalikan dengan jumlah volume media BWW yang digunakan untuk preparasi *swim-up* sperma.

Contoh Penghitungan

Kauda epididimis ditambahkan 15 μL larutan BWW dan dilakukan metode *swim-up*. Misalkan penghitungan pada ruang hitung hemositometer yang satu menghasilkan 320 sperma, sedangkan pada ruang hitung yang lainnya didapatkan 280 sperma. Kedua hasil ini dijumlahkan dan dibagi dua untuk mendapatkan rata-ratanya, sehingga didapatkan rata-rata sperma dari kedua ruang hitung adalah 300. Untuk memperoleh kepekatan sperma per nL, rata-rata penghitungan sperma dari dua ruang hitung tadi dibagi 100, sehingga diperoleh bilangan sperma 3×10^6 per mL suspensi sperma. Untuk memperoleh bilangan sperma per kauda epididimis, konsentrasi sperma tadi (3×10^6 sperma per mL) dikalikan dengan volume BWW yang digunakan untuk *swim-up* pada penyediaan sampel sperma (15 mL) menghasilkan: 45×10^6 sperma per kauda epididimis tikus.



Gambar 4.5. Ringkasan langkah-langkah penghitungan sperma.

Alat dan Bahan

- Mikroskop kontras fase atau mikroskop cahaya (perbesaran 10X, 20X, dan 40x obyektif)
- *Improved Neubauer Haemocytometer*
- Gelas penutup hemasitometer
- Cawan petri untuk tempat suspensi sperma
- Gelas ukur
- Satu set alat bedah
- Hand-counter
- Mikropipette 10 μ L; tip pipette
- Incubator CO2
- Medium BWW

Komposisi Medium Biggers, Whitten & Whittingham (BWW)

Komposisi	g/l	mM
NaCl	5.540	94.59
KCl	0.356	4.78
CaCl ₂	0.189	1.71
KH ₂ PO ₄	0.162	1.19
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.294	1.19
NaHCO ₃	2.106	25.07
Na-piruvat	0.028	0.25
Na-laktat	2.416	21.58
Glukosa	1.000	5.56
Albumin	4.000	-
Antibiotik	1.000	-

pH = 7.4

BAB V

Motilitas Sperma

Pola motilitas merupakan salah satu dari variabel yang paling penting sekaligus paling sederhana dalam menentukan potensi kesuburan sperma karena sperma imotil tidak akan dapat melakukan penetrasi lapisan mukus serviks menuju ovum untuk terjadinya pembuahan. Motilitas sperma juga mempengaruhi kemampuan pembuahan sperma, karena ayunan yang kuat pada ekor sperma sangat diperlukan untuk penetrasi kepala sperma menembus lapisan ovum (Clouarte 2005; Fitria 2000; Guraya 1986).

Gerak progresif merupakan gerak sperma normal. Gerak melingkar dan gerak reversi seringkali merupakan tanda terjadinya *cold shock* atau karena abnormalitas morfologi sperma. Sedangkan gerak bergelombang dan gerak bergetar seringkali terjadi pada sperma dari lelaki yang lanjut usia (Atherton 1977).

Motilitas sperma diamati setelah pengenceran dengan medium baik garam fisiologi atau medium nutrisi yang lain. Sperma diamati di bawah slide mikroskop dengan/tanpa gelas penutup atau dengan pipa kapiler. Telah banyak usaha dilakukan untuk mempercepat penentuan visual motilitas sperma dan menjadikannya objektif. Spektrofotometri, rekaman video dan kamera, imbasan dengan mikroskop yang dihubungkan dengan komputer, telah dapat mengurangi subjektivitas dalam penentuan motilitas sperma. Namun demikian pengamatan secara manual dengan skala arbitrari masih merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menguji motilitas sperma (Das 1985; Kuster 2005; Strader 1996).

Prinsip

Pengujian dibuat dengan pengamatan langsung dengan mikroskop pembesaran 20x objektif. Pengujian motilitas sperma harus dilakukan segera untuk menghindari artefak yang disebabkan

oleh penurunan suhu atau dehidrasi sampel. Motilitas sperma ditentukan dengan menghitung semua sperma motil dan imotil. Beberapa bidang pandang dipilih secara acak (hindari bidang yang dekat dengan tepi gelas penutup). jika lebih daripada 25 persen sperma berkumpul, pengujian motilitas hanya dilakukan pada sperma yang bebas, dan pada kasus ini perlu diberikan catatan. Sperma dengan kepala cacat atau ekor tanpa kepala diabaikan.

Motilitas sperma ditentukan secara subjektif dengan menggunakan hemositometer (preparasi sampel sperma dan aplikasinya ke hemositometer adalah sama seperti pada bagian penghitungan jumlah sperma). Jumlah sperma yang bergerak dihitung pada 9 hingga 16 kotak besar pada area sentral dari masing-masing ruang hitung. Motilitas sperma ditentukan mengikuti kriteria seperti yang ditetapkan oleh WHO (1999) dan dilambangkan dengan huruf a, b, c, d (dari yang paling cepat sampai yang paling lambat) sebagai berikut:

- a : motilitas progresif ; $\geq 25 \mu\text{m/s}$ di mana $25 \mu\text{m}$ adalah sama dengan panjang 5 kepala sperma
- b : motilitas perlahan ; $< 5 \mu\text{m/s}$
- c : motilitas sangat perlahan
- d : tiada pergerakan (imotil)

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 200x. Kira-kira 100 sperma pada setiap ruang hitung hemositometer diperhatikan untuk menentukan progresinya.

Protokol

1. Lekatkan gelas penutup slide hemositometer seperti pada prosedur penghitungan jumlah sperma (rujuk pada protokol penghitungan sperma)
2. Sebanyak $10 \mu\text{L}$ suspensi sperma (cara penyediaan sperma seperti pada Bab III) diambil dengan pipet, kemudian disisipkan ke dalam ruang di antara gelas penutup dan slide hemositometer pada salah satu ruang hitung hemositometer.

Ruang hitung lainnya juga diisi dengan cara yang sama. Proses pengisian ini mengikuti metode yang sama seperti pada metode penghitungan jumlah sperma (rujuk pada protokol penghitungan sperma).

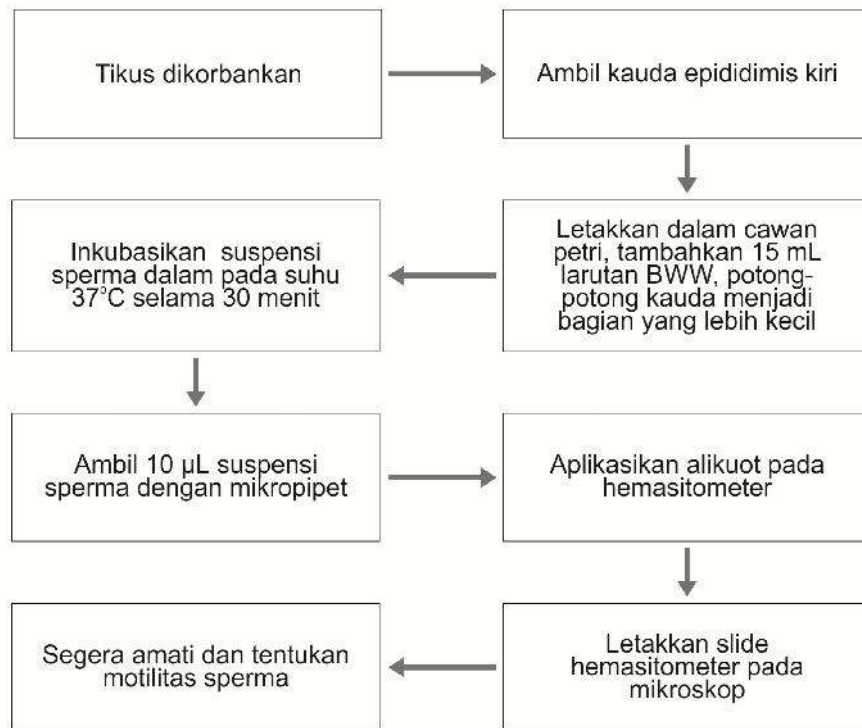
3. Suhu merupakan faktor yang penting dalam penentuan motilitas sperma. Oleh karena itu slide hemasitometer, gelas penutup, dan tip mikropipet ikut diletakkan dalam inkubator bersama dengan sampel sperma sebelum digunakan.
4. Pengujian motilitas sperma dilakukan segera setelah pengisian sampel ke ruang hitung. Seperti pada penghitungan jumlah sperma, penggunaan mikroskop fase kontras lebih dianjurkan karena sperma akan terlihat lebih jelas.
5. Sembilan hingga enam belas kotak besar digunakan dalam setiap ruang hitung.
6. hitung terlebih dulu semua sperma progresif dan perlahan. Kemudian hitung sperma sangat perlahan dan imotil pada bidang yang sama. Cara yang sama digunakan pada kotak-kotak seterusnya. Keempat tingkat motilitas (a, b, c, d) diekspresikan dalam persentase.
7. Sekurang-kurangnya 100 sperma diamati pada setiap ruang hitung. Sehingga sekurang-kurangnya total 200 sperma diamati pada kedua ruang hitung.

Kalkulasi

Untuk tiap-tiap preparasi, total jumlah sperma pada tiap kategori dibagi dengan total jumlah sperma yang dinilai untuk memperoleh persentase untuk ke empat kategori (a-d).

Hasil

Persentase 4 kategori motilitas, persentase sperma motil sperma (a+b+c) dan (optional) persentase progresif sperma(a+b) dituliskap pada laporan.



Gambar 5.1. Ringkasan langkah-langkah analisis motilitas sperma.

Alat dan bahan

Seperti pada penghitungan sperma (rujuk pada Bab IV).

BAB VI

Morfologi Sperma

Morfologi merupakan aspek struktural sperma. Penentuan morfologi sperma secara subjektif didasarkan pada bentuk kepala sperma dan ekor baik pada preparasi dengan pewarnaan dan langsung diamati atau dimounting terlebih dulu kemudian diamati menggunakan mikroskop (Clegg et al, 2001).

Pada umumnya, morfologi sperma diuji baik dengan preparasi basah sperma epididimis menggunakan mikroskop fase kontras, atau dikering-anginkan dan diwarnai kemudian diamati dengan mikroskop cahaya konvensional. Pengujian 200 hingga 500 sperma setiap sampel hewan uji diperlukan untuk dapat mendeteksi perubahan yang terjadi. Setiap sperma diberi skor sebagai normal atau tidak normal, dan bentuk-bentuk tertentu dikategorikan sebagai abnormal pada kepala, bagian tengah, atau ekor. Abnormalitas pada kepala sperma mencakup: kait tumpul, kepala berbentuk pisang, bentuk kepala tidak teratur, kepala bentuk jarum, dan kepala ganda. Namun demikian sukar untuk membedakan batas-batas dari bentuk-bentuk tersebut secara meyakinkan. Automasi penentuan morfologi sperma menggunakan CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*) lebih sukar lagi untuk sperma tikus disebabkan kepala berbentuk kait, dan CASA dioptimasi untuk kepala sperma manusia yang berbentuk bulat atau oval. Preparasi sampel memainkan peranan penting dalam penentuan morfologi sperma. Sperma harus terletak horisontal untuk menjamin pengujian kait secara tepat. Orientasi yang tidak horisontal dapat menyebabkan artefak visual dan mengakibatkan kesalahan pengkategorian sperma normal menjadi tidak normal. Perbedaan kecil seperti kait yang hampir lurus menunjukkan spermiasi prematur, sedangkan kait tumpul menandakan akrosom abnormal atau degenerasi akrosom. Bentuk abnormal yang lebih jelas seperti kepala ganda, bentuk tidak teratur, atau spermatozoa bersatu, lebih mudah dikenali dan mencerminkan malformasi yang lebih signifikan secara biologi. Tambahan lagi,

morfologi abnormal, seperti kepala terlepas atau ekor abnormal, berkorelasi dengan viabiliti sperma dan menandakan kematian sel setelah spermiasi (Perreault & Cancel, 2001).

Sperma ideal ialah sperma tanpa cacat morfologi. Semua penyimpangan dari morfologi ideal dikategorikan sebagai cacat. Ada 3 jenis cacat yaitu cacat pada daerah kepala, cacat pada leher/bagian tengah dan cacat ekor. Sperma dengan satu atau lebih cacat morfologi dikategorikan sebagai tidak normal.

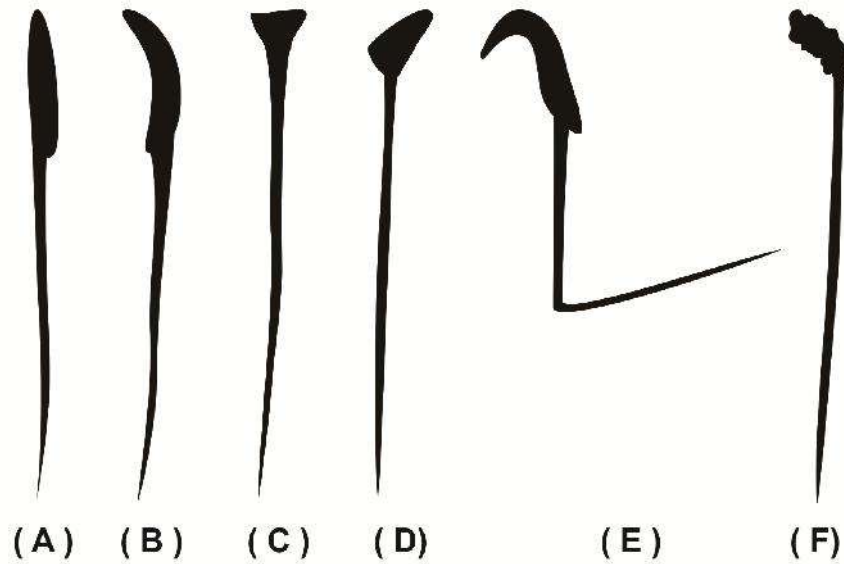
Sperma yang matang dan ideal mempunyai bentuk kepala kait (seperti pancing) dengan hanya satu ekor yang melekat. Ekor tidak terpilin. Tepat setelah kepala adalah bagian tengah, yang agak tebal. Tetes sitoplasma normal mempunyai garis luar halus (tidak irregular, ukurannya kurang daripada 1/3 kepala sperma normal).

Morfologi yang nampak dalam mikroskop bukanlah morfologi sperma hidup yang sebenarnya, tetapi merupakan gambaran yang kita ciptakan. Gambaran ini dipengaruhi oleh teknik apus, fiksasi, pewarnaan, mounting, dan kualitas mikroskop. Kriteria pengkelasan hanyalah tahap akhir yang mana kita mendeskripsikan gambaran yang diciptakan selama preparasi. Dengan metode yang standar dan dengan kontrol kualitas, kita dapat meminimumkan eror.

Menghitung Bentuk Abnormal

Penilaian ini berhubungan hanya dengan daerah utama sperma (kepala, ekor). Perbedaan antara abnormalitas yang berbeda antara kepala, atau antara cacat ekor yang berbeda tidak dilakukan. Berikut adalah kategori yang diuji (Filler, 1993):

- Cacat kepala : Tidak berkait, bentuk pisang, bentuk pin, bulat, amorfous, kepala berganda, atau kombinasi cacat-cacat tersebut.
- Cacat ekor: pendek, double (multiple), terpilin, rusak, bengkok (sudut $>90^\circ$), lebar tak teratur, ekor berkoil, atau kombinasi abnormalitas tersebut. Ekor putus tidak dihitung.



Gambar 6.1. Beberapa contoh morfologi sperma abnormal. (A) Kepala tidak terkait, (B) kepala bentuk pisang, (C) & (D) kepala bentuk pin, (E) ekor bengkok, (F) kepala amorfous.

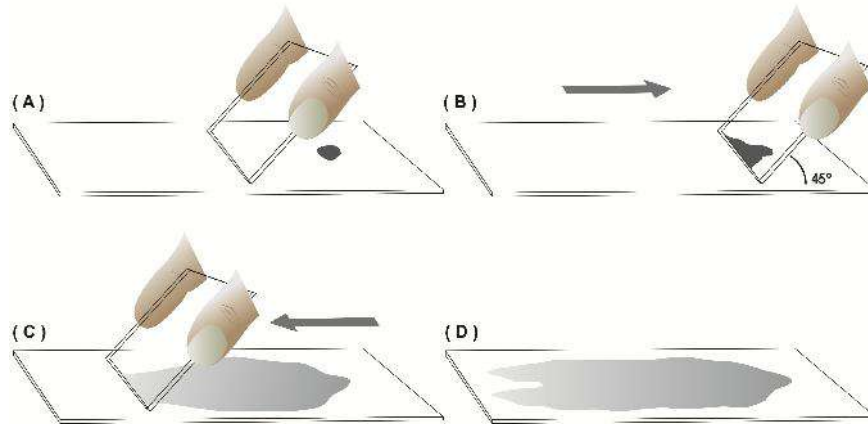
Prinsip

Preparasi (smear dan pewarnaan) untuk pengujian morfologi sperma harus betul-betul teliti. Artefak kecil yang disebabkan metode yang tidak konsisten dapat mempengaruhi kenampakan sperma.

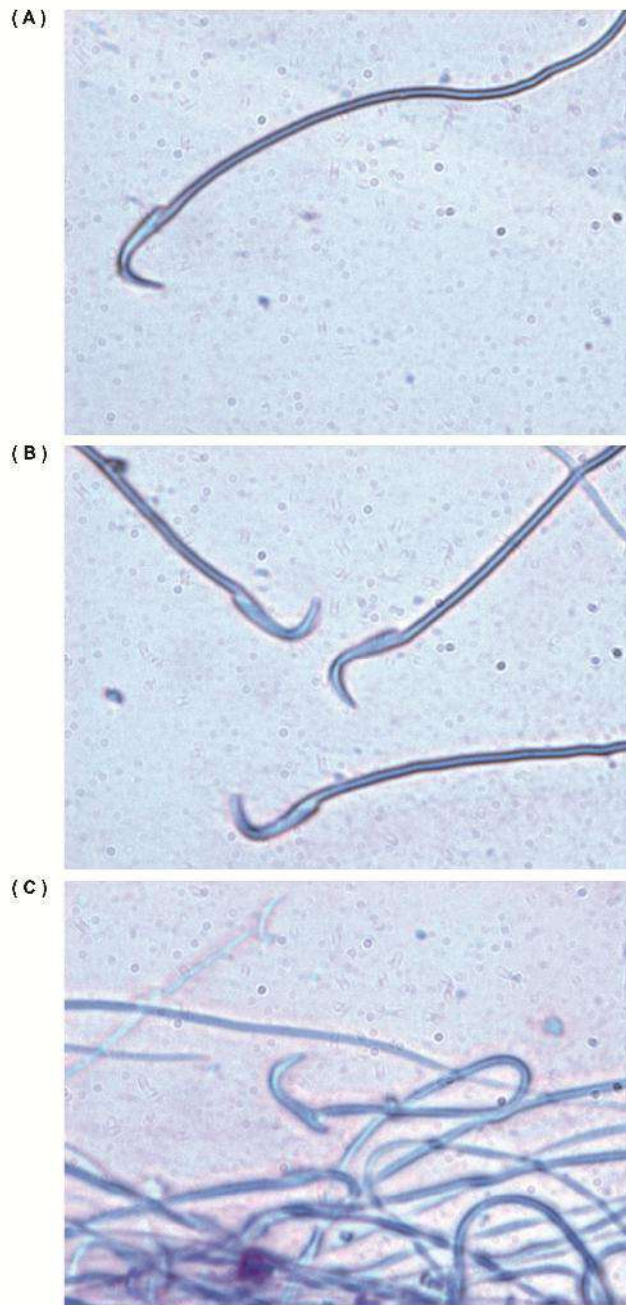
Slide untuk morfologi harus benar-benar bersih dari lemak (minyak) untuk menjamin bahwa smear melekat pada slide. Jika tidak smear dapat tanggal (lepas) dari slide pada waktu fiksasi atau pewarnaan. slide dibersihkan dengan etanol 95% atau etanol absolut untuk menjadikan smear melekat kuat pada slide.

Tiga buah slide smear dibuat dari setiap sampel sperma untuk pengujian morfologi. Volume tertentu dari suspensi sperma (yang disesuaikan dengan konsentrasi sperma untuk mengurangi terlalu padatnya sperma) diletakkan pada slide dan tetes suspensi tersebut disebar menggunakan tepi slide penutup atau slide mikroskop

lain. Smear harus rata dan tipis untuk memberikan pewarnaan yang bagus dan memudahkan pengujian. Smear kemudian dikering anginkan, segera setelah smear kering, slide difiksasi dan diwarnai.



Gambar 6.2. Teknik apus/ smear sperma. (A) Letakkan slide kedua di atas slide pertama. (B) Geser slide kedua sampai menyentuh tetes suspensi. Biarkan menyebar oleh gaya kapiler. (C) Geser lagi ke arah berlawanan dengan sekali gerakan untuk menghasilkan smear sperma. (D) Slide dengan smear sperma.



Gambar 6.3. (A) dan (B) Morfologi sperma normal tikus. (C) Sperma yang terlalu mengelompok.

Protokol

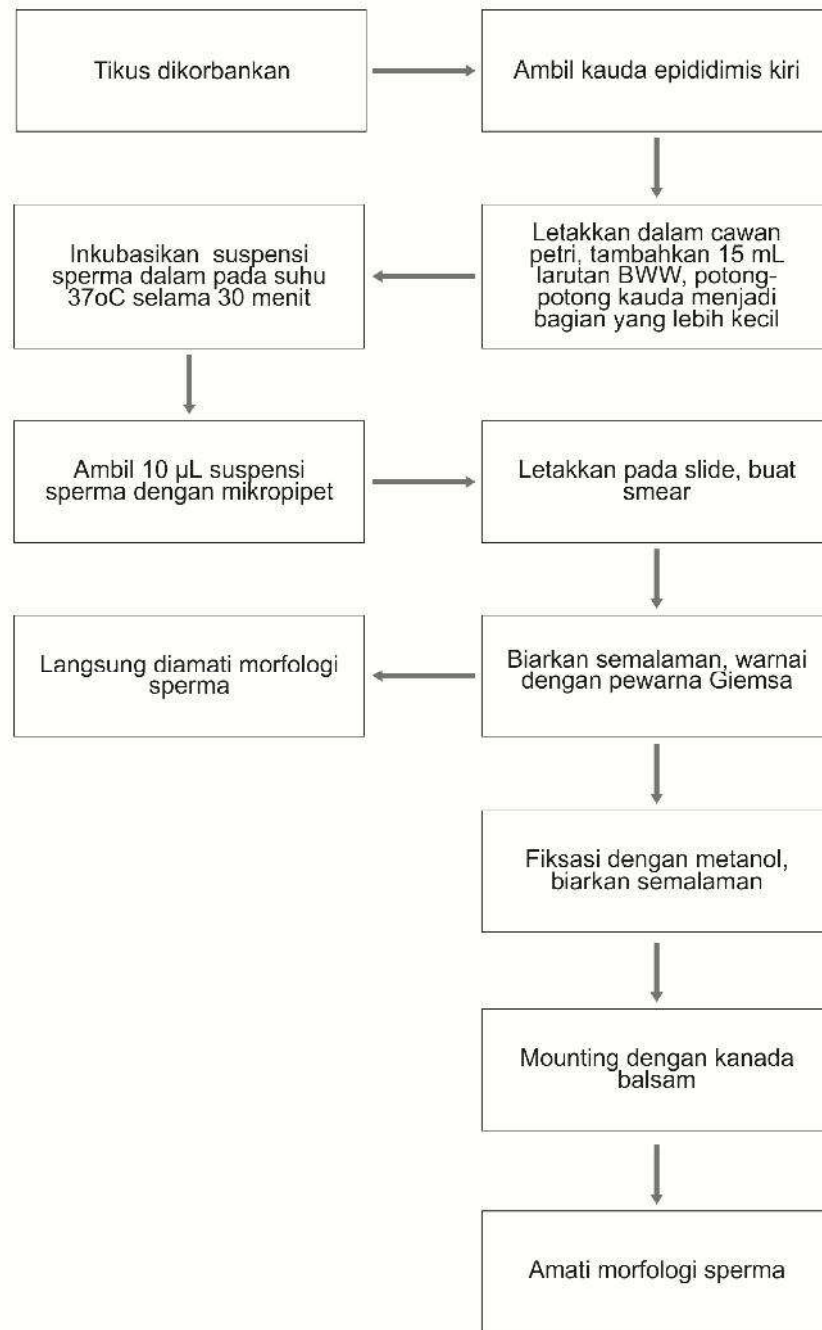
1. Sebanyak tiga slide smear sperma disediakan untuk setiap sampel (dari setiap ekor tikus). Tambahan slide ini dapat digunakan untuk konfirmasi adanya artefak atau sebagai tambahan untuk dievaluasi jika jumlah sperma rendah.
2. Buat preparasi smear/apus sperma (seperti membuat preparat smear/apus darah). Letakkan slide pada permukaan datar. Teteskan dua puluh μL suspensi sperma (cara penyediaan suspensi seperti pada 6.2.A) kira-kira 2,5 cm dari tepi slide. Pegang Slide kedua dengan tangan kanan pada sisi panjangnya, letakkan sisi lebar slide ini ke slide pertama, kemudian sentuhkan pada tetesan pada sudut yang terbentuk antara 2 slide, kemudian ditarik menjauh dari tetesan. Ini mesti dilakukan dengan daya minimum untuk menghindari kerusakan sperma karena preparasi (Gambar 6.2.)
3. Smear dikering-anginkan. Sandarkan slide dengan kemiringan sudut $30\text{-}40^\circ$ dan alasi bagian bawahnya dengan tisu untuk menyerap kelebihan suspensi. Biarkan semalaman (smear dapat disimpan untuk beberapa hari hingga diwarnai).
4. Sediaan difiksasi dengan metanol 70% dan dikeringkan pada suhu kamar.
5. Pewarnaan Giemsa dilakukan dengan meneteskan 2 mL larutan Giemsa selama 5 menit pada suhu kamar ke atas slide tadi.
6. Slide dibasuh dengan air suling sebanyak dua kali dan dibiarkan kering pada suhu kamar. Slide dapat terus diamati atau dimounting dulu dengan canada balsam.
7. Slide diamati di bawah mikroskop cahaya, dimulai dengan perbesaran 100X.
8. Amati keseluruhan bidang slide secara sekilas untuk menentukan kualitas preparasinya. Jika terlalu banyak sperma yang berkelompok atau sangat sedikit sperma, jangan dipakai. Buat smear slide yang baru.

9. Sejumlah 200 sperma dihitung dari setiap slide (WHO 1999; Kvist&Bjorndahl2002; Ellis et al 1998). Penentuan morfologi normal/abnormal ditentukan dengan merujuk pada kriteria yang dikemukakan oleh Filler (1993) dan gambar 6.1. (sperma abnormal).
10. Pada umumnya, hingga 200 sperma dapat ditentukan morfologinya pada satu slide. Tetapi jika tidak, dapat digunakan slide tambahan.

Kalkulasi dan Hasil

Data dituliskan dalam formulir laporan

1. % sperma normal, atau
2. % Sperma abnormal



Gambar 6.4. Ringkasan langkah-langkah analisis morfologi sperma.

Alat dan Bahan

- Mikroskop cahaya (perbesaran 10X, 20X, dan 40x obyektif)
- Slide mikroskop (ukuran standard)
- Gelas penutup (24x60 mm)
- Cawan petri untuk tempat suspensi sperma
- Satu set alat bedah
- Hand-counter
- Mikropipette 20 μ L; tip pipette
- Mounting resin (canada balsam)
- Metanol
- Air suling
- Larutan Giemsa

Penyediaan Pewarna Giemsa

Serbuk Giemsa	1 g
Gliserin	66 ml
Metanol	66 ml

Campurkan serbuk Giemsa dengan gliserin dan kocok hingga campuran merata. Inkubasi campuran pada suhu 60°C selama 2 jam. Setelah itu, metanol ditambahkan dan larutan dibiarkan tercampur merata. Pewarna Giemsa siap digunakan.

Referensi

- Amann, R. P. 1986. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environmental Health Perspectives* **70**: 149-158.
- Austin, C.R. 1968. *Fertilization*. Prentice-Hall. New Delhi.
- Austin, C. R. and Short, R.V. 1978. *Germ Cells & Fertilization*. Cambridge University Press. London.
- Ariens, E.J., Mutschler, E., dan Simons, A.M. 1986. *Toksikologi Umum*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Terjemahan.
- Atherton, R.W. 1977. Evaluation of sperm motility. in *Techniques of Human Andrology* (E.S.E. Hafez, ed.). Elsevier. Amsterdam. pp 175-179
- Beagley, D.J., Firth., J.A., and Houlst, D.R.S. 1980. *Human Reproduction & Developmental Biology*. The Macmillan Press. London.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K., and Whittingham, D. 1971. The culture of mouse embryos in vitro. in *Methods in Mammalian Embryology* (J.C. Daniel, ed.). Freeman, San Francisco, CA.
- Briggs, G.B. & Oehme, F.W. 1980. Toxicology. in *The Laboratory Rat* (H.J. Baker et al. eds). Volume II. Research Application. Academic Press. New York. pp 104-118.
- Cao, W. , Haig-Ladewig, L., Gerton, G.L., and Moss, S.B. 2006. Adenylate kinases 1 and 2 are part of the accessory structures in the mouse sperm flagellum. *Biology of Reproduction* **75**: 492-500.
- Clegg, E.D., Perreault, S.D., and Klinefelter, G.R. 2001. Assesment of male reproductive toxicity. in *Principles and Methods of Toxicology*. A.W. Hayes, ed). Fourth editions. Taylor & Francis. Philadelphia. pp 1264-1292.
- Cloutre, D. 2005. New help male fertility. *Total Health* **26** (4): 26-27.
- Das, R. P. 1985. Assessment of spermatozoal function. *J. Biosci.* **7** (2): 245-255.

- Ellis, M.K., Richardson, A. G., Foster, J. R., Smith, F. M., Widdowson, P. S. , Farnsworth, M. J., Moore, R. B., Pitts, M. R. G., and Wickramaratne, A.S. 1998. The reproductive toxicity of molinate and metabolites to the male Rat: effects on testosterone and sperm morphology. *Toxicology and Applied Pharmacology* **151**: 22-32.
- Farnsworth, N.R. 1992. Preclinical Assesment of Medicinal Plants. In *Natural Resources and Human Health – Plants of Medicinal and Nutritional Value* (S. Baba et al. eds). Elsevier. Amsterdam.
- Filler, R. 1993. Method for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In *Methods in toxicology. Male Reproductive Toxicology* (R.E. Chapin & J.J. Heindel, eds). Volume 3A. San Diego. California.
- Fitria, L. 2000. *Pengaruh ekstrak kuda laut (Hippocampus kuda Bleeker) terhadap spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit jantan (Mus musculus L.)*. skripsi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Tidak dipublikasikan.
- Ford, W.C.L. 2006. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update* **12** (3): 269-274.
- Freund, M. and Carol, B. 1964. Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human semen. *Journal of Reproduction and Fertility* **8**: 149-155.
- Gitlits, V.M., Toh, B. H., Loveland, K.L., and Sentry, J. W. 2000. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. *European Journal of Cell Biology* **79**: 104 -111.
- Golden, A.L. 2002. Biomarkers of male reproductive health. in *Biomarkers of Environmentally Associated Disease. Technologies, Concepts, and Perspectives* (S.H. Wilson, & W.A. Suk, eds). Lewis Publisher. New York.
- Greaves, P. 1990. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation*. Elsevier. Amsterdam.
- Guan, J. 2009. *Mammalian Sperm Flagella and Cilia*. Master Thesis. Department of Cell and Molecular Biology. Karolinska Institutet. Stockholm. Sweden.
- Guraya, S.S. 1986. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Springer Verlag. Berlin.

- Hamburger, M. & Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30** (12): 3864-3874.
- Hamilton, D.W. 1975. Structure, function of the epithelium lining the ductuli efferents, ductus epididymis and ductus deferens in the rat. in *Handbook of Physiology* (D.W. Hamilton & R.O. Greep, eds). Section VII, Endocrinology, vol.5, Male Reproductive System. American Physiological Society, Washington D.C. pp 259-301.
- Hawcroft, D., Hector, T. & Rowell, R. 1987. *Quantitative Bioassay*. John Wiley & Sons. London.
- Hess, R.A. 1998. Spermatogenesis, Overview in Encyclopedia of Reproduction (E. Knobil & J.D. Neill, eds). vol. 4. Academic Press. San Diego. pp 539-545.
- Hirsh, A. 2003. Male subfertility. *BMJ* **327**: 669-672.
- Horimoto, M., Isobe, Y., Isogai, Y., and Tachibana, M. 2000. Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexandione. *Reproductive Toxicology* **14**: 55-63.
- Huang, X., Kong, L., Li, X., Chen, X., Guo, M., and Zou, H. 2004. Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography B* **812**: 71-84.
- Huggins. 2003. Alternatives to developmental/reproductive toxicity testing in animals. *ALTEX* **20**, Suppl.1: 32-41.
- Johnson, M. and Everift, B. 1984. *Essential Reproduction*. Second Edition. Blackwell Scientific Publications. London.
- Jones, R. 1998. Plasma membran struktur & remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* **53**: 73-84.
- Junquiera, L.C. & Carneiro, J. 1988. *Histologi Dasar*. Terjemahan. Edisi ke-3. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Kempinas, W.G., T.L. Lamano-Carvalho. 1988. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. *Laboratory Animals* **22**: 154-156.

- Kierszenbaum, A.L. 1994. Mammalian Spermatogenesis in Vivo and in Vitro: A Partnership of Spermatogenic and Somatic Cell Lineages. *Endocrine Reviews* **15** (1): 116-134.
- Kuster, C. 2005. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different. *Theriogenology* **64**: 614-617.
- Kvist, V. & Bjorndahl, L. 2002. *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monograph. Oxford University Press. Oxford.
- Leeson, T. S., & C.R. Leeson. 1981. *Histology*. Fourth edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Liska, F. 2003. Selected genetic models of male infertility – what animal models tell us. *Folia Biologica* **49**: 129-141.
- Luthfi, M. J. 2010. *Pengasingan, Pengenalpastian, dan Pencirian Sebatian Bioaktif Lunasia amara Blanco yang Meningkatkan Kesuburan Jantan*. Disertasi. Universiti Kebangsaan Malaysia. Tidak dipublikasikan.
- Maynard, L.A., Loosli, J.K., Hintz, H.K., and Warner, R.G. 1979. *Animal Nutrition*. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Macpherson, M.L. 2001. *How to Evaluate Semen in the Field*. Proceedings of the 47th Annual Convention of the AAEP. San Diego, California. pp: 412-416.
- Nallella, K.P., R. K. Sharma, N. Aziz, A. Agarwal. 2006. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility* **85** (3): 629-654.
- Niederberger, C., Joyce, G.F., Wise, M., and Meacham, R.B. 2004. Male infertility. in *Urologic Diseases in America* (M.S. Litwin & C.S. Saigal, eds). U.S. Department of Health and Human Services. Washington DC. pp 461-481.
- Perreault, S.D. and Cancel, A. M. 2001. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. *Reproduction* **121**: 207-216.
- Plant, T.M., & Marshall, G.R. 2001. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocrine Reviews* **22** (6): 784-786.

- Prasad, M.R.N., Chinoy, N.J., Kadam. K.M. 1972. Changes in succinic dehydrogenase levels in the rat epididymis under normal and altered physiologic conditions. *Fertility and Sterility* **23** (3): 186-190.
- Preusch, P.C. 2004. Integrative and organ systems pharmacology: A new initiative from the National Institute of General Medical Sciences. *Molecular Intervention* **4** (2): 72-73.
- Purchase, I.F.H., Botham, P.A., Bruner, L.H., Flint, O.P., Frazier, J.M., and Stokes, W.S. 1998. Workshop overview: Scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicological Sciences* **43**: 86-101.
- Rajeev, S.K. & Reddy, K.V.R. 2004. Sperm membrane protein profile of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility associated sperm antigen. *Human Reproduction* **19** (2): 234-242.
- Reinhard, J.F. 1982. Pharmacological screening. in *The Mouse in Biomedical Research* (H.L. Foster, et al. eds). Volume IV. Experimental biology and oncology. Academic Press. USA. pp 314-326.
- Rodrigues, A.D. 1997. Preclinical drug metabolism in the age of high-throughput screening: An industrial perspective. *Pharmaceutical Research* **14** (11): 1504-1510.
- Rodriguez-Martinez, H. 2006. Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reprod Dom Anim* **41** (Suppl.2): 2-10.
- Rothmann, S.A., A. A. Reese. 2007. Semen analysis: the test techs love to hate. *Medical Laboratory Observer* **39** (4): 18-27.
- Strader, L.F., Linder, R. E. & Perreault. S.D. 1996. Comparison of rat epididymal sperm counts by IVOS HTM-IDENT and hemocytometer. *Reproductive Toxicology* **10** (6): 529-533.
- Tulsiani, D.R.P., Orgebin-Crist, M.C. & Skudlarek, M.D. 1998. Role of luminal fluid glycotrasferases and glycosidases in the modifications of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* **53**: 85-97.
- Turner, C.D. & J.T. Bagnara. 1976. *General Endocrinology*. 6th edition. W.B. Saunders. Philadelphia.
- Turner, R.M. 2003. Tales from the tail: What do we really know review about sperm motility? *Journal of Andrology* **24** (6): 790-803.

- Walsh, G. 2003. *Biopharmaceutical : Biochemistry and Biotechnology*. Second Edition. John Wiley & Sons. Chichester.
- White, W.J. 2001. The use of laboratory animals in toxicologic research. in *Principles and Methods of Toxicology* (A.W. Hayes, eds. Fourth Edition. Taylor & Francis. Philadelphia.
- WHO. 1999. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press. New York.
- Wier, P.J., and Rumberger, D. 1995. Isolation of rat sperm from the vas deferens for sperm motility analysis. *Reproductive Toxicology* **9** (3): 327-330.
- Working, P.K. 1988. Male Reproductive Toxicology: Comparison of the Human to Animal Models. *Environmental Health Perspectives* **77**: 37-44.
- Working, P.K., and Hurtt, M.E. 1987. Computerized videomicrographic analysis of rat sperm motility. *Journal of Andrology* **8**: 330-337.
- Wyrobek, A.J., and Bruce, W.R. 1975. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4426.
- Yamashiro, H., Toyomizu, M., Kadowaki, A., Takeda, Z., Nakazato, F., Toyama, N., Kobayashi, J., and Sato, E. 2009. Oxidation of exogenous lactate by lactate dehydrogenase C in the midpiece of rat epididymal sperm is essential for motility and oxidative activity. *American Journal of Applied Sciences* **6** (10): 1854-1859.
- Yang, C., Compton, M. M. & Yang, P. 2005. Dimeric novel HSP40 is incorporated into the radial spoke complex during the assembly process in flagella. *Molecular Biology of the Cell* **16**:637-648.
- Zanefeld, L.J.D. & Chatterton, R.T. 1982. *Biochemistry of Mammalian Reproduction*. Wiley. New York.
- Zenick, H. and Clegg, E.D. 1989. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. in *Principles and Methods of Toxicology* (A.W. Hayes, eds). Second edition. Raven Press. New York.
- Zenick, H. & Clegg, E.D. (1989) Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. in *Principles and Methods of Toxicology* (A.W. Hayes, eds). Second edition. Raven Press. New York.

ANALISIS KUALITAS SPERMA TIKUS PERCOBAAN (Jumlah, Motilitas, dan Morfologi)

Panduan yang ringkas namun bernas ini menjelaskan langkah demi langkah tahapan analisis kualitas sperma hewan percobaan (*Rattus norvegicus*) meliputi jumlah/bilangan, motilitas, dan morfologi sperma. Walaupun banyak manual tentang analisis kualitas sperma manusia, sangat sedikit literatur yang menjelaskan analisis kualitas sperma pada hewan percobaan secara terperinci. Selain memiliki arti penting dalam penelitian dasar biologi reproduksi, penelitian dengan menggunakan hewan percobaan harus selalu dilakukan untuk pemahaman awal kondisi pada manusia dan segala sesuatu yang mungkin diperlukan untuk mendukung hipotesis pada manusia, khususnya dibidang reproduksi.

Buku ini diawali dengan pemahaman penggunaan hewan coba rodent dalam penelitian dibidang reproduksi jantan, fisiologi sistem reproduksinya sampai pada teknik pemeriksaan/analisis kualitas sperma. Foto, gambar dan bagan digunakan secara luas untuk memudahkan pemahaman konsep dan cara analisis.

Buku ini penting sebagai acuan atau rujukan bagi para mahasiswa, dosen dan peneliti di bidang biologi reproduksi khususnya analisis kualitas sperma. Buku ini akan memandu langkah-langkah analisis kualitas sperma hewan percobaan agar menghasilkan data yang valid dan akurat.



Sebelas Maret University Press
Jl. Ir. Sutarni 36 A, Kentingan, Surakarta 57126
Telp. (0271) 646994 Psw.341
www.unspress.uns.ac.id

