

PEMERIKSAAN KELAINAN SPERMA PADA PRIA INFERTIL DENGAN ANALISIS ANILIN BLUE DAN TOLUIDIN BLUE: STUDI LITERATUR

Liya Agustin Umar^{1*}, Mala Kurniati²

¹Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Bengkulu

²Departemen Biologi Kedokteran, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas
Kedokteran, Universitas Malahayati

[*Email Korespondensi: liyaagustinumar@unib.ac.id]

Abstract: Examination of Sperm Ability nn Infertile Men Using Aniline Blue and Toluidine Blue Analysis: Literature Study. Based on research, sperm chromatin abnormalities can affect male infertility. One way to find out is to check the maturity and density of sperm using Anilin Blue and Toluidin Blue staining. Because Anilin Blue can describe condensation in sperm chromatin, while Toluidin Blue is a sensitive test for imperfect DNA structure and packaging. Examination of sperm chromatin abnormalities using Anilin Blue and Toluidin Blue staining showed a correlation with sperm morphology, there was also a positive correlation between sperm maturity and sperm density with a strong and significant correlation interpretation. There was also an increase in the percentage of spema that could not be stained by Anilin Blue and Toluidin Blue staining in a sperm ejaculate in fertile normozoospermic individuals. This provides an input to consider conducting Anilin Blue and Toluidin Blue examination as a routine examination related to improving the quality of sperm DNA before carrying out the assisted reproduction technology (ART) process, which is expected to increase the success rate of ART.

Keywords: Sperm, Chromatin, Anilin Blue, Toluidin Blue

Abstrak: Pemeriksaan Kelainan Sperma Pada Pria Infertil Dengan Analisis Anilin Blue Dan Toluidin Blue: Studi Literatur. Berdasarkan penelitian, kelainan kromatin sperma dapat berpengaruh terhadap infertilitas pada pria. Salah satu cara untuk mengetahuinya ialah dengan memeriksa tingkat pematangan (maturitas) dan tingkat kepadatan sperma menggunakan pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue. Hal ini dikarenakan Anilin Blue dapat menggambarkan kondensasi pada kromatin sperma, sedangkan Toluidin Blue merupakan tes yang sensitif untuk mengetahui struktur dan pengemasan DNA yang tidak sempurna. Pemeriksaan kelainan kromatin sperma menggunakan pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue menunjukkan korelasi terhadap morfologi sperma, terdapat juga korelasi positif antara maturitas sperma dan kepadatan sperma dengan interpretasi korelasi yang kuat dan signifikan. Selain itu juga terdapat peningkatan persentase spema yang tidak dapat diwarnai oleh pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue didalam suatu ejakulat sperma pada orang normozoospermia yang fertil. Hal ini memberikan suatu masukan untuk mempertimbangkan melakukan pemeriksaan Anilin Blue dan Toluidin Blue sebagai pemeriksaan rutin terkait peningkatan kualitas DNA sperma sebelum melakukan proses reproduksi berbantuan, sehingga diharapkan dapat meningkatkan tingkat keberhasilannya.

Kata kunci : Sperma, Kromatin, Anilin Blue, Toluidin Blue

PENDAHULUAN

Infertilitas diartikan sebagai ketidakmampuan pasangan untuk memiliki anak dalam jangka waktu 1

tahun, dengan periode berhubungan seksual secara rutin, tanpa kontrasepsi, dan tidak dalam jarak jauh. Kasus ini diperkirakan terjadi pada sekitar 15 %

pasangan menikah yang mewakili sekitar 140 juta orang diseluruh dunia ((O'Flynn O'Brien et al., 2010). Di Indonesia sendiri masalah infertilitas merupakan masalah yang kompleks, terkait penyediaan pelayanan kesehatan dan tingginya tingkat infertilitas pada populasi. Perkiraan jumlah rata-rata infertilitas, yang paling banyak pada tingkat konservatif sekitar 10 % - 15 % dari populasi usia reproduktif (Bennett et al., 2012). Penyebab infertilitas dapat terjadi pada laki-laki dan perempuan. Sekitar 15 %- 30 % penyebab infertilitas pada laki-laki ialah akibat kelainan genetik. Kontribusi genetik antara lain mempengaruhi berbagai proses fisiologis termasuk keseimbangan hormonal, spermatogenesis, dan kualitas sperma. Oleh karena itu, pemahaman genetik mendasar dari kegagalan reproduksi tersebut sangat penting untuk menangani pasangan infertilitas (Monavari et al., 2013).

Berdasarkan kasus yang terjadi, penyebab utama infertilitas pada laki-laki bisa meliputi varikokel, gangguan endokrin, kondisi imunologi, kerusakan saluran kelamin, gonatoksin, infeksi, disfungsi seksual, ejakulasi dini dan lain-lain. Namun sekitar 70 % dari penyebab infertilitas pada laki-laki tidak diketahui penyebabnya (idiopatik) (Schagdarsurengin et al., 2012). Hal ini tentu saja dapat menjadi bahan kajian penelitian guna menjelaskan pengaruh-

METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah studi literatur. Dalam metode ini akan dilakukan dengan cara pengumpulan data pustaka, membaca dan mencatat intisari dari bacaan, lalu diolah sebagai bahan tulisan. Pengumpulan data berasal dari buku teks, jurnal, artikel ilmiah, dan studi literatur lainnya. Pencarian data secara online dilakukan melalui pencarian pada *google scholar*, dan database *Pubmed*. Langkah selanjutnya adalah memulai membaca dari yang paling relevan, sampai ke cukup relevan. Mencatat bagian yang penting, kemudian disusun secara sistematis.

pengaruh baik eksternal maupun internal yang dapat menjadi penyebab utama masalah kesuburan ini. Salah satu ranah penelitian yang sekarang sedang banyak dikembangkan ialah melihat pengaruh epigenetik pada spermatozoa (Hekmatdoost et al., 2009). Pada manusia, kualitas gamet menjadi penentu baik dalam reproduksi secara alami maupun berbantu (Assisted Reproductive Technology/ART). DNA sperma diketahui menyumbang setengah jumlah genom pada zigot, sehingga kualitas DNA sperma menjadi bagian yang penting untuk kesuksesan reproduksi (Hekmatdoost et al., 2009).

Berdasarkan manual WHO tahun 2010, parameter pemeriksaan sperma pria meliputi konsentrasi, morfologi/bentuk, dan motilitas. Namun berdasarkan penelitian, kelainan kromatin sperma juga mempengaruhi terhadap infertilitas pada pria. Salah satu cara untuk mengetahuinya ialah dengan memeriksa tingkat pematangan (maturitas) dan tingkat kepadatan sperma menggunakan pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue. Hal ini dikarenakan Anilin Blue dapat menggambarkan kondensasi pada kromatin sperma, sedangkan Toluidin Blue merupakan tes yang sensitif untuk mengetahui struktur dan pengemasan DNA yang tidak sempurna (World Health Organization, 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil studi literatur didapatkan 25 sumber dengan menggunakan kata kunci *Sperm/Sperma, Chromatin, Anilin Blue, Toluidin Blue*. Hasil berupa jurnal dan buku tersebut kemudian disusun dan dilakukan studi literatur.

Spermatogenesis

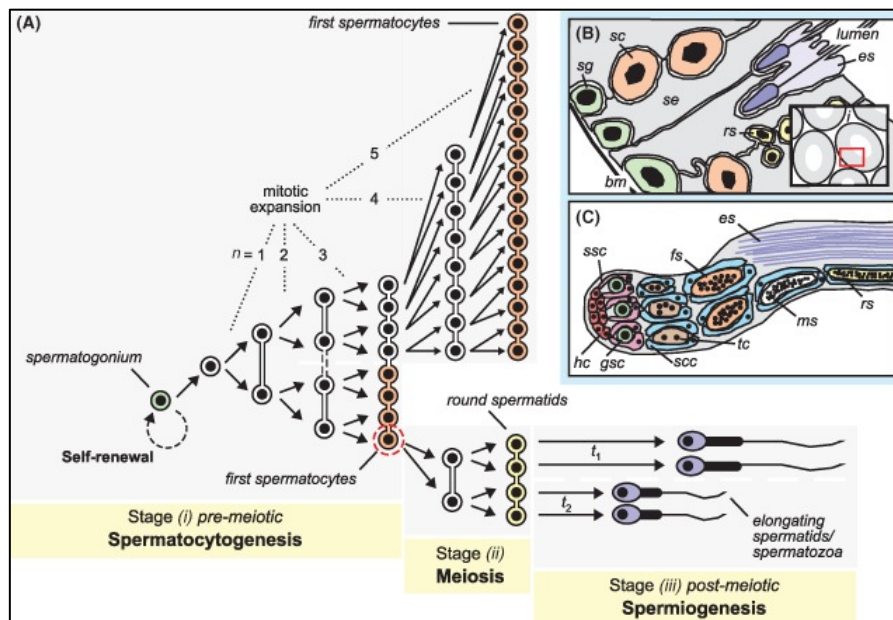
Spermatogenesis dapat diartikan sebagai proses pembentukan spermatozoa dari sel spermatogonium melalui pembelahan mitosis dan meiosis yang kinerjanya diatur oleh hormon. Proses ini juga diikuti oleh

spermiogenesis, sehingga terjadi pematangan spermatozoa (Linn et al., 2021).

Salah satu sel awal dalam jalur ini disebut spermatosit primer. Setiap spermatosit primer membelah menjadi dua spermatosit sekunder, dan masing-masing spermatosit sekunder menjadi dua spermatid atau spermatozoa muda. Sel ini berkembang menjadi spermatozoa matang, yang disebut sel sperma. Dengan demikian, spermatosit primer menghasilkan dua sel, spermatosit sekunder, dengan subdivisi yang menghasilkan empat spermatozoa. Spermatogonium mempunyai jumlah kromosom diploid (2n). Spermatogonium ini menempati membran basah atau bagian terluar dari Tubulus Seminiferus yang akan mendapatkan nutrisi dari sel-sel sertoli dan berkembang menjadi Spermatosit Primer. Spermatosit Primer mengandung kromosom diploid (2n) pada intinya dan mengalami meiosis. Satu spermatosit akan menghasilkan dua anak, yaitu Spermatosit Sekunder. Proses pembentukan Spermatosit Sekunder, dimulai saat Spermatosit Primer menjauhi dari lamina basalis, sitoplasma makin banyak, dan terjadilah

meiosis pertama yang membentuk dua spermatosit sekunder yang masing-masing memiliki kromosom haploid (1n) (Cordeiro et al., 2021).

Proses meiosis pertama ini langsung diikuti dengan pembelahan meiosis kedua yang membentuk empat spermatid, masing-masing dengan kromosom haploid. Akhirnya spermatid akan bertransformasi membentuk spermatozoa. Proses spermatogenesis ini terjadi pada suhu normal tetapi lebih rendah dari pada suhu tubuh, dan proses ini juga dipengaruhi oleh sel sertoli. Pada fase awal spermatogenesis, spermatogonium bersifat diploid (2n). Secara mitosis, spermatogonium akan berubah menjadi spermatosit primer (2n). Berikutnya, spermatosit primer membelah menjadi spermatosit sekunder secara meiosis (Meiosis I). Jumlah spermatosit sekunder ada dua, sama besar dan bersifat haploid (n). Melalui fase Meiosis II, spermatosit sekunder membelah menjadi empat spermatid yang sama bentuk dan ukurannya. Selanjutnya, spermatid berkembang menjadi sperma matang yang bersifat haploid (n) (Griswold, 2016).

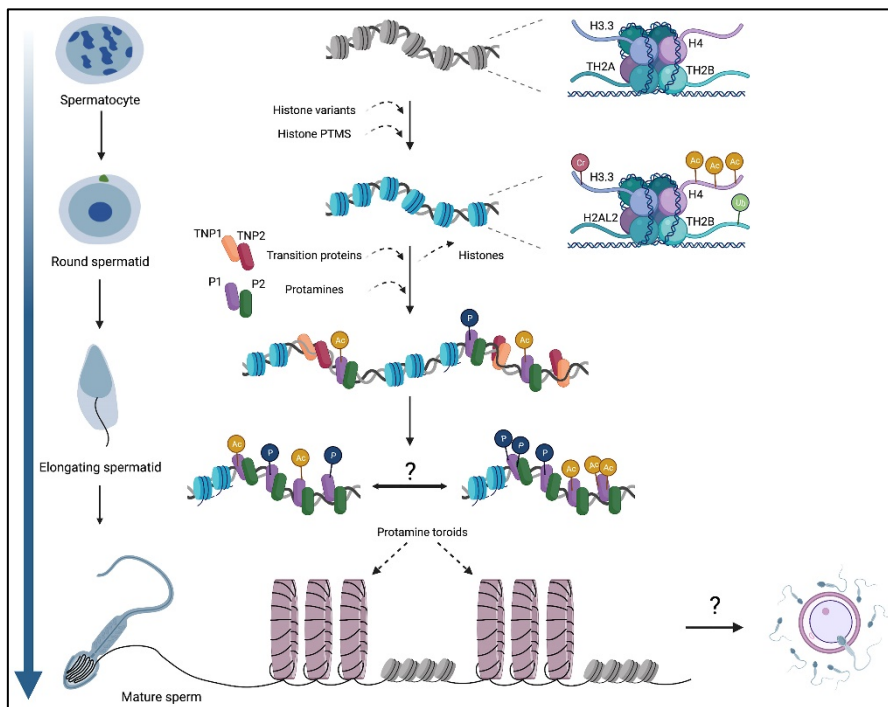


Gambar 1. Proses spermatogenesis. (A) Tiga tahap utama spermatogenesis: (i) spermatositogenesis, (ii) meiosis, dan (iii) spermiogenesis (B) Spermatogenesis pada mamalia (C) Spermatogenesis lalat drosophila (Ramm & Schärer, 2014).

Spermatogenesis itu sendiri terdiri dari tiga tahap utama, yaitu proliferasi spermatogonia, meiosis spermatosit, dan spermiogenesis spermatid haploid. Selama proses spermiogenesis, *round* haploid memasuki fase elongasi, sel-sel germinal mengalami transformasi dan sejumlah besar histon somatik mengalami penggantian, yaitu penggantian histon oleh protein transisi dan akhirnya oleh protamin untuk penyusunan DNA ke dalam inti spermatozoa. Selama tahap elongasi spermatid pada spermiogenesis, sekitar 85% histon pada spermatozoa akan diganti oleh protamin (Rahman et al., 2013).

Struktur Kromatin Sperma Manusia

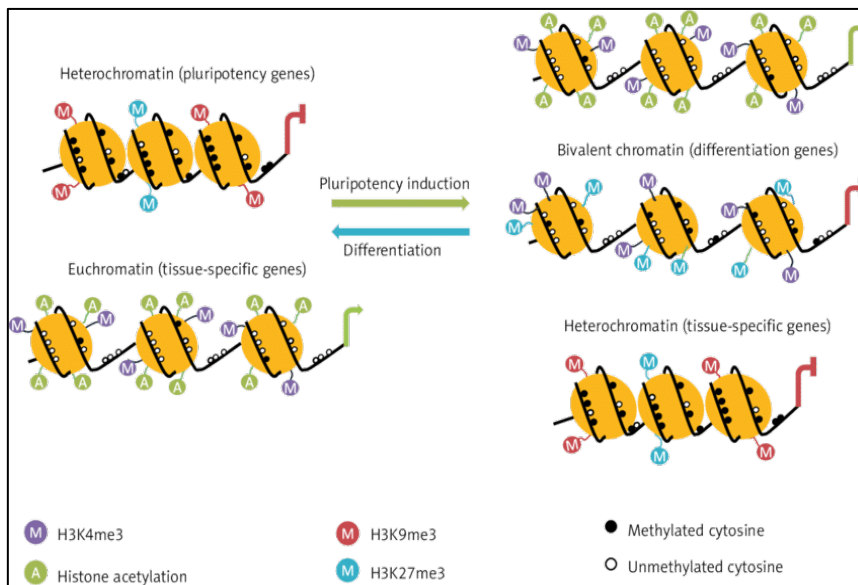
Kromatin sperma merupakan struktur yang sangat kompak, padat dan stabil sehingga dibutuhkan cara pengemasan yang khusus untuk membentuknya. Selama perubahan pepadatan kromatin sperma, histon diganti dengan protein transisi. Protein ini kemudian digantikan oleh protein yang lebih mendasar bernama protamin (P1, P2), yang bertanggung jawab untuk kondensasi akhir dan stabilisasi DNA sperma. DNA sperma berinteraksi dengan protamin sehingga membentuk DNA sperma yang melingkar ke subunit toroidal disebut sebagai "*Doughnut loop*" (Hekmatdoost et al., 2009; Ward, 2009).



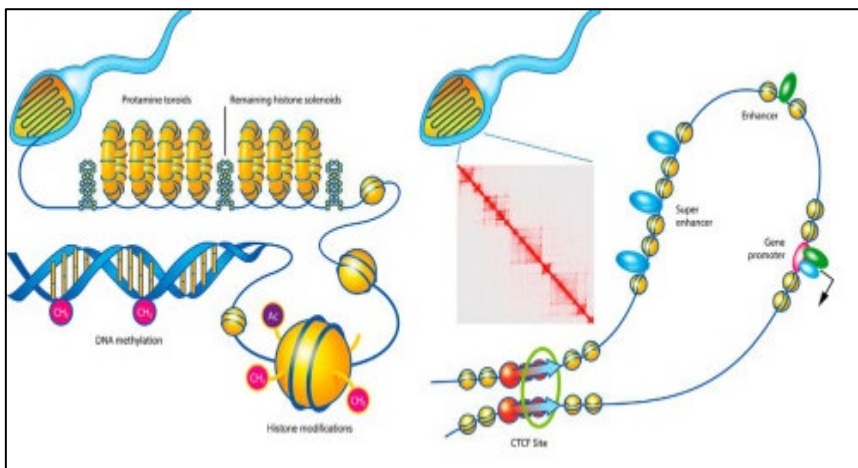
Gambar 2. Spermatozoa dan pengemasan DNA sperma (Moritz & Hammoud, 2022).

Kromatin sperma manusia memiliki struktur terorganisasi yang tersusun dari DNA dan nukleoprotein yang heterogen. Salah satu aspek yang membedakan sel somatik dengan sel sperma ialah 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 histon (Hadi, 2011).



(A)



(B)

Gambar 3. (A) Kromatin pada sel somatik ; (B) Kromatin pada sel sperma (Gładych et al., 2015; Gold et al., 2018).

Etiologi dan Mekanisme Kelainan Kromatin Sperma

Kelainan kromatin sperma dapat terjadi akibat korelasi dari banyak faktor, seperti akibat leukositospermia, sehingga terjadi peningkatan jumlah leukosit didalam semen akibat adanya infeksi pada alat kelamin dan inflamasi. Leukositospermia terjadi akibat meningkatnya sitokin yang merupakan faktor inflamasi, lalu diikuti dengan produksi yang berlebihan dari ROS (*Reactive Oksigen Species*). Adapun

mekanisme kelainan kromatin sperma dapat terjadi akibat:

a. Pengemasan kromatin yang abnormal

Penggantian somatik histon oleh protamin berperan penting dalam penyusunan inti kromatin, pematangan spermatozoa. dan fertilitas serta berperan penting dalam pemindahan genom ke dalam kepala spermatozoa yang matang. terjadinya penurunan jumlah spermatozoa, penurunan motilitas, dan morfologi spermatozoa,

peningkatan kelainan kromatin spermatozoa, penurunan viabilitas spermatozoa, meningkatnya kerusakan DNA spermatozoa, dan infertilitas pada pria (Sellami et al., 2013). Meskipun ketidaksempurnaan dapat timbul pada setiap tahap proses ini, masalah yang paling umum ialah sebab pembentukan lingkaran DNA domain yang abnormal dan penggantian Histon-protamin (Hekmatdoost et al., 2009).

b. Apoptosis

Apoptosis ialah suatu proses kematian sel yang terjadi pada sel tunggal secara terencana yang ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimiawi khas sebagai akibat dari inisiasi oleh stimuli fisiologis maupun patologis tanpa menimbulkan reaksi radang. Apoptosis diperlukan untuk kelangsungan spermatogenesis secara normal dan untuk homeostasis seluler serta keseimbangan antara sel germinal dengan sel Sertoli. Apoptosis secara seluler merupakan proses normal yang terjadi selama perkembangan embrional. Selama proses spermatogenesis telah dilaporkan terjadi proses apoptosis yang diatur oleh ekspresi gen p53, p21, kaspase, bcl-2 dan Fas (Asadi et al., 2021).

Kajian terhadap apoptosis pada sperma manusia telah mengungkapkan tentang adanya hubungan antara apoptosis dan kualitas sperma. Apoptosis pada spermatozoa secara signifikan berkorelasi dengan parameter kualitas semen konvensional. Proses apoptosis mungkin diatur dalam

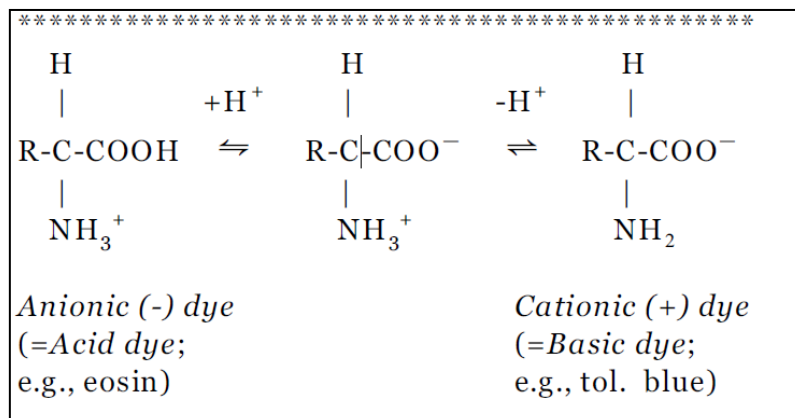
peristiwa spermatogenesis sebelum ejakulasi. Penentuan adanya apoptosis pada spermatozoa dapat meningkatkan kriteria seleksi dalam teknologi reproduksi berbantuan (ART) (Asadi et al., 2021).

c. Stres Oksidatif

Penyebab paling umum dari kerusakan DNA sperma akibat Stres oksidatif (OS). Stres oksidatif (OS) ialah ketidakseimbangan antara pembentukan *Spesies Reactive Oxygen* (ROS) dan kapasitas antioksidan untuk menetralkan atau menghilangkannya. ROS dapat merusak DNA melalui modifikasi atau penghapusan basa, pergeseran bingkai baca, cross linkage, rearrangement kromosom, patahan pada untai tunggal atau ganda DNA, dan mutasi gen (Alahmar, 2019; Wagner et al., 2018).

Pewarnaan Anilin Blue Dan Toluidin Blue

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan, pewarnaan yang digunakan untuk melihat kelainan kromatin pada sperma ialah Anilin Blue dan Toluidin Blue. Anilin Blue bersifat anionic dye/acid dye sedangkan Toluidin Blue bersifat *cationic dye/basic dye*. *Anionic dye* ialah pewarna yang dapat mengikat asam amino yang bermuatan positif, larutannya bersifat asam. Sedangkan *cationic dye* ialah pewarna yang dapat mengikat asam amino yang bermuatan negatif, larutannya bersifat basa (Sato et al., 2010).

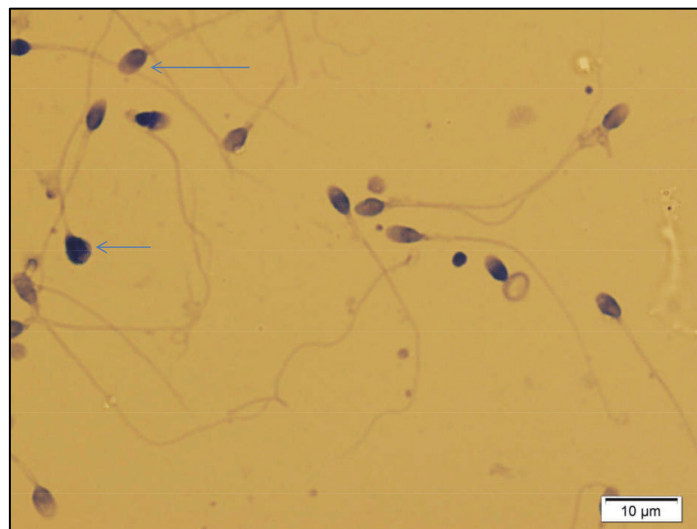


Gambar 4. Perbedaan pewarna anionik dan kationik (D’Ilario & Martinelli, 2006).

a. Anilin Blue

Anilin Biru (AB) dapat membedakan berkas warna antara histon kaya lisin dan arginine dengan protamin yang kaya sistein. Pewarna ini khusus bereaksi dengan residu lisin dalam nukleus histon dan menunjukkan perbedaan dalam komposisi nukleus protein dasar sperma. Inti yang banyak terdapat kromatin sperma yang belum matang, akan banyak histon yang mengandung lisin dan akibatnya akan menunjukkan berkas warna biru yang

lebih pekat. Sedangkan di sisi lain, kromatin yang terdapat pada spermatozoa matang/ normal akan banyak mengandung protamin yang kaya arginin dan sistein, sehingga mengandung tingkat lisin yang relatif rendahnya, dan akibatnya sperma tersebut tidak akan terwarnai oleh anilin biru. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4b yang menunjukkan perwarnaan sperma dengan Anilin Blue (AUGER et al., 1990; Pourmasumi et al., 2019).



Gambar 5. Pewarnaan anilin biru (AB) untuk mendeteksi histon yang berlebihan pada kromatin sperma. Spermatozoa bernoda biru pucat (AB-) normal, dan spermatozoa bernoda biru tua (AB+) dianggap abnormal (Rahiminia et al., 2018).

b. Toluidin Blue

Pewarnaan Toluidin Blue (TB) telah digunakan sebagai alat pewarnaan sitologi untuk pengenalan jaringan dan diagnosis kanker. Baru-baru ini, dilaporkan pewarnaan Toluidin Blue berpotensi untuk diagnosis infertilitas. Toluidin Blue (TB) merupakan zat warna kationik yang penting dalam pewarnaan biologi karena efek metakromatiknya. Metakromatik ialah perubahan warna yang diperlihatkan zat warna ketika terikat untuk makromolekul biologis tertentu atau ketika terkonsentrasi dilarutkan. Karakteristik ini memungkinkan untuk mewarnai elemen jaringan tertentu dalam berbagai warna menggunakan pewarna tunggal (Sato et al., 2010).

Toluidin biru (TB) digunakan untuk menandai metakromasia dan ortokromasia pada pewarnaan kromatin. Disebut Metakromasia bila terjadi pergeseran warna contohnya bila digunakan untuk mewarnai sel Mast, berubah menjadi pink, sedangkan pewarnaan biru biasa disebut ortokromasia. Prinsip pewarnaan Toluidin Blue ialah zat warna toluidin akan lebih banyak diikat oleh gugus fosfat dari untaian DNA sperma yang memiliki kepadatan yang kurang baik (Pourmasumi et al., 2019). Bila kepadatan sperma tinggi maka warna yang ditimbulkan tidak terlalu pekat bahkan tidak terwarnai sama sekali sedangkan bila sperma tersebut kepadatan kromatinnya rendah maka akan terwarnai ungu yang pekat. Oleh

karena itu, untuk lebih meningkatkan akurasi maka pewarnaan TB harus digunakan dalam kombinasi dengan metode pewarnaan lain yang lebih handal untuk penilaian kepadatan kromatin sperma (Auger et al., 1990; D'Ilario & Martinelli, 2006; Sato et al., 2010).

Peran DNA menjadi sangat penting dalam proses pewarisan sifat dari orang tua ke anak-anaknya. Kondisi DNA dari kedua gamet parental akan sangat menentukan kondisi DNA zigot. Hal ini terjadi karena adanya proses singgami yang menyatukan 2 materi genetik yang dibawa oleh sperma dan materi genetik yang ada pada sel telur (ovum). Pengemasan DNA sperma berguna untuk melindungi DNA sperma dari pengaruh lingkungan, sampai terjadi fertilisasi. Namun dengan pengemasan sedemikian rupa pun DNA sperma tetap rentan mengalami kerusakan.²² Banyak tes untuk struktur kromatin sperma yang telah dikembangkan, dalam upaya menentukan apakah penyebab idiopatik pada kasus infertilitas pria dapat dijelaskan akibat adanya kerusakan pada kromatin sperma. Alasannya ialah bahwa kerusakan kromatin mungkin tidak tercermin dalam morfologi sperma, motilitas, atau bahkan kemampuannya untuk membuahi ovum. Namun, kelainan kromatin sperma mungkin dapat mengurangi bahkan menghalangi kemampuan spermatozoa untuk membuahi dan menghambat perkembangan embrio (Shaman & Ward, 2006a).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh banyak peneliti, diketahui bahwa penyebab kerusakan DNA sperma antara lain akibat abnormalitas pengemasan kromatin sperma, apoptosis, dan stress oksidatif. Pemeriksaan kromatin sperma dapat dilakukan dengan memeriksa tingkat pematangan (maturitas) dan tingkat kepadatan sperma menggunakan pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue. Hal ini penting dilakukan karena pada pemeriksaan analisis sperma yang umum dilakukan hanya melihat konsentrasi, morfologi dan motilitas saja, padahal kondisi DNA yang ada

pada sperma memiliki peranan penting terhadap kesuksesan fertilisasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kim et al (2013), menunjukkan bahwa analisis kerusakan DNA sperma menggunakan pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue menunjukkan korelasi terhadap morfologi sperma. Sedangkan penelitian yang dilakukan Syauqy dkk (2013) pada pasien program IVF (*in vitro fertilization*) menunjukkan adanya korelasi yang kuat antara maturitas dan kepadatan sperma yang di analisis menggunakan pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue (Kim et al., 2013; Syauqy, 2013).

Arah korelasi antara kedua variable dilihat dari angka koefisiensi korelasi yang hasilnya positif yaitu 0,739 yang berarti korelasinya bersifat searah yaitu bila nilai maturitas kromatin sperma tinggi maka nilai kepadatan kromatin spermanya juga tinggi (Syauqy, 2013). Dadoune et al. (1988) dan Hofmann et al. (1990), didalam ejakulat normal harus mengandung setidaknya 75% spermatozoa yang tidak terwarnai dengan pewarna Anilin Blue, yang menunjukkan kematangan normal ejakulasi spermatozoa.²⁴ Hasil penelitian sementara ini menunjukkan peningkatan persentase sperma yang tidak terwarnai untuk menunjukkan suatu ejakulat sperma tersebut normal. Untuk pewarnaan Toluidin Blue, didalam ejakulat normal tidak boleh mengandung 35 % sperma yang terwarnai (dark) (Shaman & Ward, 2006b). Hal ini sesuai dengan penelitian sementara yang telah dilakukan bahwa rata-rata sperma yang terwarnai dengan pewarnaan Toluidin Blue pada orang normozoospermia yang fertil sekitar 20 %. Hal ini memberikan suatu masukan untuk mempertimbangkan melakukan pemeriksaan Anilin Blue dan Toluidin Blue sebagai pemeriksaan rutin terkait peningkatan kualitas DNA sperma sebelum melakukan proses reproduksi berbantuan (Asisted Reproduction Technology/ ART) , sehingga diharapkan dapat meningkatkan tingkat keberhasilan ART. ART ialah teknik bidang kedokteran

untuk membantu proses reproduksi dengan cara mengatasi hambatan bertemunya spermatozoa dan oosit, sehingga memungkinkan terjadinya konsepsi pada pasangan infertil.

KESIMPULAN

Pemeriksaan kelainan kromatin sperma menggunakan pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue menunjukkan korelasi terhadap morfologi sperma, terdapat juga korelasi positif antara maturitas sperma dan kepadatan sperma dengan interpretasi korelasi yang kuat dan signifikan. Selain itu juga terdapat peningkatan persentase sperma yang tidak dapat diwarnai oleh pewarnaan Anilin Blue dan Toluidin Blue didalam suatu ejakulat sperma pada orang normozoospermia yang fertil. Hal ini memberikan suatu masukan untuk mempertimbangkan melakukan pemeriksaan Anilin Blue dan Toluidin Blue sebagai pemeriksaan rutin terkait peningkatan kualitas DNA sperma sebelum melakukan proses reproduksi berbantuan (Asisted Reproduction Technology/ ART), sehingga diharapkan dapat meningkatkan tingkat keberhasilan ART.

DAFTAR PUSTAKA

- Alahmar, A. (2019). Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. In *Journal of Human Reproductive Sciences* (Vol. 12, Issue 1, pp. 4–18). Wolters Kluwer Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_150_18
- Asadi, A., Ghahremani, R., Abdolmaleki, A., & Rajaei, F. (2021). Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review. In *International Journal of Reproductive BioMedicine* (Vol. 19, Issue 6, pp. 493–504). Research and Clinical Center for Infertility. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i6.9371>
- AUGER, J., MESBAH, M., HUBER, C., & DADOUNE, J. P. (1990). Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *International Journal of Andrology*, 13(6), 452–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1990.tb01052.x>
- Bennett, L. R., Wiweko, B., Hinting, A., Adnyana, I. P., & Pangestu, M. (2012). Indonesian infertility patients' health seeking behaviour and patterns of access to biomedical infertility care: An interviewer administered survey conducted in three clinics. In *Reproductive Health* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1742-4755-9-24>
- Cordeiro, D. A., Costa, G. M. J., & França, L. R. (2021). Testis structure, duration of spermatogenesis and daily sperm production in four wild cricetid rodent species (*A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus*, and *O. nigripes*). *PLoS ONE*, 16(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251256>
- D'Ilario, L., & Martinelli, A. (2006). Toluidine blue: Aggregation properties and structural aspects. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 14(4), 581–595. <https://doi.org/10.1088/0965-0393/14/4/003>
- Gładych, M., Andrzejewska, A., Oleksiewicz, U., & Estécio, M. R. H. (2015). Epigenetic mechanisms of induced pluripotency. In *Wspolczesna Onkologia* (Vol. 1A, pp. A30–A38). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.47135>
- Gold, H. B., Jung, Y. H., & Corces, V. G. (2018). Not just heads and tails: The complexity of the sperm epigenome. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 293, Issue 36, pp. 13815–13820). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.001561>
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*, 96, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>.-Mam
- Hadi, R. S. (2011). Apoptosis Pada Sperma Sebagai Petanda Adanya Gangguan Kesuburan Pria. In *Majalah Kesehatan PharmaMedika* (Vol. 3, Issue 2).
- Hekmatdoost, A., Lakpour, N., & Sadeghi, M. R. (2009). Sperm Chromatin Integrity: Etiologies and Mechanisms of Abnormality, Assays, Clinical Importance, Preventing and Repairing Damage. In *Review Article 147 Avicenna J Med Biotech* (Vol. 1, Issue 3).
- Kim, H. S., Kang, M. J., Kim, S. A., Oh, S. K., Kim, H., Ku, S. Y., Kim, S. H., Moon, S. Y., & Choi, Y. M. (2013). The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 40(1), 23–28. <https://doi.org/10.5653/cerm.2013.40.1.23>
- Linn, E., Ghanem, L., Bhakta, H., Greer, C., & Avella, M. (2021). Genes Regulating Spermatogenesis and Sperm Function Associated With Rare Disorders. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634536>
- Monavari, S. H., Vaziri, M. S., Khalili, M., Shamsi-Shahrabadi, M., Keyvani, H., Mollaei, H., & Fazlalipour, M. (2013). Asymptomatic seminal infection of herpes simplex virus: Impact on male infertility. *Journal of Biomedical Research*, 27(1), 56–61. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20110139>
- Moritz, L., & Hammoud, S. S. (2022). The Art of Packaging the Sperm Genome: Molecular and Structural Basis of the Histone-To-Protamine Exchange. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.895502>
- O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C., & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertility and Sterility*, 93(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.045>
- Pourmasumi, S., Khoradmehr, A., Rahiminia, T., Sabeti, P., Reza, A., 2*, T., & Ghasemzadeh, J. (2019). Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. In *J Reprod Infertil* (Vol. 20, Issue 2). <http://www.jri.ir>
- Rahiminia, T., Yazd, E. F., Fesahat, F., Moein, M. R., Mirjalili, A. M., & Talebi, A. R. (2018). Sperm chromatin and DNA integrity, methyltransferase mRNA levels, and global DNA methylation in oligoasthenoteratozoospermia. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 45(1), 17–24. <https://doi.org/10.5653/cerm.2018.45.1.17>
- Rahman, M. S., Lee, J. S., Kwon, W. S., & Pang, M. G. (2013). Sperm proteomics: Road to male fertility and contraception. In *International Journal of Endocrinology* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/360986>
- Ramm, S. A., & Schärer, L. (2014). The evolutionary ecology of testicular function: Size isn't everything. *Biological Reviews*, 89(4), 874–888. <https://doi.org/10.1111/brv.12084>
- Sato, S., Matsumoto, S., Freivalds, T. L., & Erenpreisa, J. (2010). Consideration on the metachromatic spectra of toluidine blue dimers formed on DNA oligomers. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 83(10), 1216–

1222.
<https://doi.org/10.1246/bcsj.20100032>
- Schagdarsurengin, U., Paradowska, A., & Steger, K. (2012). Analysing the sperm epigenome: Roles in early embryogenesis and assisted reproduction. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 9, Issue 11, pp. 609–619).
<https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.183>
- Sellami, A., Chakroun, N., ben Zarrouk, S., Sellami, H., Kebaili, S., Rebai, T., & Keskes, L. (2013). Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: Useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Advances in Urology*.
<https://doi.org/10.1155/2013/578631>
- Shaman, J. A., & Ward, W. S. (2006a). Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration* (pp. 31–48). Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.003>
- Shaman, J. A., & Ward, W. S. (2006b). Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration* (pp. 31–48). Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.003>
- Syauqy, A. (2013). *Evaluasi Maturitas dan Kepadatan Kromatin Sperma dari Pasangan Infertilitas yang Memiliki Kualitas Oosit Baik: Hubungannya dengan Tingkat Pembelahan Zigot pada Program IVF*. Universitas Indonesia.
- Wagner, H., Cheng, J. W., & Ko, E. Y. (2018). Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>
- Ward, W. S. (2009). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 16, Issue 1, pp. 30–36).
<https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>
- World Health Organization. (2021). *Laboratory Manual For The Examination And Processing Of Human Semen Sixth Edition*.