

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Semen

a. Cairan Semen

Cairan semen manusia merupakan cairan biologis unik yang tidak terbentuk sempurna di dalam tubuh, melainkan baru terbentuk saat proses ejakulasi melalui pencampuran sekresi berbagai kelenjar secara berurutan (Björndahl dkk., 2023). Secara fundamental, semen merupakan fluida heterogen yang tersusun atas dua komponen utama, yaitu komponen seluler dan plasma semen (Rodriguez-Martinez dkk., 2021).

Komponen seluler mencakup spermatozoa sebagai unsur utama, sel benih imatur, leukosit, serta sel epitel. Sementara itu, plasma semen (*seminal plasma*) merupakan komponen non-seluler yang berfungsi sebagai medium cair esensial untuk mendukung transportasi, metabolisme, dan kelangsungan hidup spermatozoa. Plasma semen terbentuk dari campuran sekresi kompleks yang berasal dari rete testis, epididimis, serta kelenjar aksesori seksual yang meliputi vesikula seminalis dan prostat. Secara fungsional, kelenjar vesikula seminalis menghasilkan faktor koagulasi yang menyebabkan semen membeku sesaat setelah ejakulasi, sedangkan kelenjar prostat memproduksi faktor

likuifaksi yang berperan dalam proses pencairan kembali semen (Barbagallo dkk., 2021).

Ditinjau dari aspek biokimia, plasma semen memiliki komposisi yang sangat kompleks, terdiri dari ion inorganik, hormon spesifik, lipid seperti kolesterol, serta berbagai jenis protein dan peptida, termasuk sitokin dan enzim. Selain itu, ditemukan pula materi genetik berupa DNA dan RNA yang sering kali terlindungi di dalam vesikel ekstraseluler agar tetap stabil dalam saluran reproduksi. Unsur-unsur spesifik seperti fruktosa berperan sebagai sumber energi utama bagi metabolisme spermatozoa, sedangkan mikronutrien seperti kalsium dan zinc memegang peranan krusial dalam perlindungan sel. Zinc secara khusus bertindak sebagai kofaktor dalam sistem antioksidan yang melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif. Integrasi dari seluruh komponen biokimia ini berfungsi secara sinergis dalam meregulasi fertilitas, melindungi integritas seluler, serta menyiapkan spermatozoa untuk menghadapi lingkungan saluran reproduksi betina (Barbagallo dkk., 2021; Rodriguez-Martinez dkk., 2021).

b. Analisis Semen

Analisis semen merupakan prosedur laboratorium fundamental yang digunakan untuk mengevaluasi potensi fertilitas pria. Analisis semen tidak hanya menilai kuantitas dan kualitas sel sperma, tetapi juga memeriksa makroskopis dan mikroskopis cairan semen. Evaluasi makroskopis dilakukan segera setelah sampel mengalami likuifaksi

sempurna, yang idealnya terjadi dalam waktu 30 hingga 60 menit setelah ejakulasi (Sunder & Leslie, 2022).

Secara makroskopis, peningkatan viskositas cairan semen (hiperviskositas) telah dikaitkan dengan peningkatan stres oksidatif serta penurunan kadar komponen penting dalam plasma seminal, seperti zinc dan fruktosa. Kondisi ini dapat mengganggu fungsi sperma, terutama motilitas dan integritas kromatin, sehingga berpotensi menurunkan kemampuan fertilisasi meskipun jumlah sperma masih dalam batas normal. Secara mikroskopis, jumlah leukosit dalam semen yang berada di bawah $1 \times 10^6/\text{mL}$ dianggap sebagai batas normal. Peningkatan konsentrasi leukosit (leukositospermia) sering dikaitkan dengan adanya infeksi atau inflamasi pada kelenjar aksesoris genital pria, yang selanjutnya dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan memperburuk kualitas sperma (Barbagallo dkk., 2021).

Pengumpulan sampel semen memerlukan persiapan yang ketat sesuai standar WHO untuk memastikan akurasi hasil. Pasien wajib abstinensi seksual selama 2 hingga 7 hari sebelum pengambilan sampel untuk menghindari variabilitas hasil analisis. Sampel idealnya dikumpulkan melalui masturbasi di laboratorium atau menggunakan kondom khusus non-toksik jika dilakukan di rumah. Sampel harus dijaga pada suhu ruang atau suhu tubuh dan diperiksa dalam waktu satu jam setelah ejakulasi (WHO, 2021).

2. Sperma

Sperma adalah salah satu jenis sel metazoa yang paling terspesialisasi, memiliki struktur yang sangat khusus yang diadaptasi untuk menemukan dan menyatu dengan sel telur (Teves & Roldan, 2022).

a. Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan serangkaian proses biologis kompleks yang terjadi di dalam tubulus seminiferus, di mana sel benih primordial berkembang menjadi spermatozoa matang yang fungsional. Kualitas morfologi sperma yang dihasilkan sangat bergantung pada keberhasilan setiap fase seluler ini, khususnya fase spermiogenesis. Morfologi sperma dianggap sebagai prediktor fertilitas yang kuat karena secara langsung mencerminkan perubahan seluler yang rumit yang terjadi selama proses pematangan tersebut, serta merepresentasikan karakteristik genetik dan integritas DNA yang dibawa oleh sperma. Gangguan pada tahap awal spermatogenesis, seperti pada fase proliferasi spermatogonia atau pembelahan meiosis spermatosit, umumnya berdampak pada penurunan jumlah sperma (oligozoospermia). Stres fisiologis seperti peningkatan suhu testis pada tahap ini juga dapat memicu kondensasi kromatin nuklir yang abnormal dan aktivasi gen p53, yang berujung pada terhentinya siklus sel atau terbentuknya sel dengan morfologi abnormal (Hussein dkk., 2024).

Tahap yang paling krusial dalam penentuan bentuk akhir spermatozoa adalah spermiogenesis, yaitu fase diferensiasi di mana

spermatid bulat berubah bentuk menjadi spermatozoa yang memiliki kepala dan ekor. Pada fase ini, terjadi proses pemadatan materi genetik. Histon digantikan oleh protamin untuk melindungi DNA. Kegagalan dalam proses biokimia ini sering kali bermanifestasi sebagai defek morfologi pada kepala sperma, seperti bentuk kepala yang amorf, besar, atau memiliki vakuola, yang menandakan ketidakstabilan kromatin atau kerusakan DNA. Selain itu, evaluasi morfologi sperma tidak hanya terbatas pada bentuk kepala, tetapi juga mencakup leher dan ekor yang terbentuk melalui migrasi sentriol dan penyusunan mitokondria. Gangguan pada mekanisme ini dapat menyebabkan kelainan pada *midpiece* atau ekor, yang secara langsung memengaruhi motilitas sperma (WHO, 2021).

Proses spermiasi atau pelepasan spermatozoa ke dalam lumen tubulus juga memiliki peran penting dalam morfologi akhir. Secara fisiologis, sisa sitoplasma yang tidak diperlukan harus dibuang oleh sel Sertoli selama proses ini. Kegagalan dalam mekanisme pelepasan ini akan menyisakan *cytoplasmic droplet* atau residu sitoplasma berlebih pada leher sperma. Menurut standar internasional, keberadaan residu sitoplasma yang ukurannya melebihi sepertiga dari ukuran kepala sperma dikategorikan sebagai abnormalitas morfologi, yang sering dikaitkan dengan fungsi epididimis yang belum optimal atau stres oksidatif. Hal tersebut membuktikan bahwa penilaian morfologi sperma menurut kriteria ketat bukan hanya sekadar evaluasi estetika sel,

melainkan alat diagnostik untuk menilai status fungsional organ reproduksi pria, khususnya testis dan epididimis (WHO, 2021).

b. Analisis Sperma

Analisis sperma merupakan salah satu parameter dalam analisis semen. Secara klinis, parameter ini krusial untuk mengidentifikasi fenotipe patologis seperti oligozoospermia, asthenozoospermia, atau teratozoospermia, yang terbukti memiliki korelasi signifikan dengan status fertilitas pria (Hussein dkk., 2024).

Analisis sperma menilai karakteristik makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi pengukuran volume semen ($>1,5$ mL), pH ($>7,2$), dan viskositas (abnormal jika ada pembentukan benang lendir sepanjang lebih dari 2 cm). Pemeriksaan mikroskopis meliputi, konsentrasi sperma (normal >15 juta/mL), total jumlah sperma (>39 juta per ejakulasi), motilitas (total motilitas $>40\%$ dan motilitas progresif $>32\%$), morfologi ($>4\%$ bentuk normal berdasarkan kriteria ketat Tygerberg), dan vitalitas ($>58\%$ sperma hidup) (WHO, 2021).

3. Morfologi Sperma

a. Normal

Berdasarkan pedoman WHO 2021, spermatozoa dikategorikan normal hanya jika memenuhi seluruh kriteria morfologis pada setiap bagian selnya. Kepala sperma harus berbentuk oval dengan kontur yang halus dan teratur. Bagian akrosom harus terdefinisi dengan jelas dan

mencakup 40-70% dari area kepala, serta tidak boleh mengandung vakuola besar (vakuola tidak boleh lebih dari 20% area kepala). Bagian leher dan *midpiece* harus ramping, teratur, dan memiliki panjang yang kira-kira sama dengan panjang kepala, serta sumbu utamanya harus sejajar dengan sumbu utama kepala. Ekor sperma normal harus memiliki kaliber yang seragam, lebih tipis dari *midpiece*, dengan panjang sekitar 45 μm (sekitar 10 kali panjang kepala), dan tidak memiliki tekukan tajam (*sharp angulation*) yang mengindikasikan kerusakan flagela (Pelzman & Sandlow, 2024).

b. Abnormal

Setiap penyimpangan dari kriteria normal diklasifikasikan sebagai abnormalitas (*teratozoospermia*). Abnormalitas morfologi sering kali bersifat majemuk (*multiple defects*), di mana satu sel sperma memiliki kelainan pada lebih dari satu bagian tubuhnya. Kategori abnormalitas berdasarkan standar WHO meliputi:

1) Abnormalitas Kepala (*Head Defects*)

Termasuk bentuk kepala yang meruncing (*tapered*), seperti buah pir (*pyriform*), bulat (*round*), amorf, atau ganda (*double heads*). Kelainan juga mencakup area akrosom yang terlalu kecil (<40%) atau terlalu besar (>70%), serta adanya vakuola yang berlebihan atau terletak di area pasca-akrosom.

2) Abnormalitas Leher dan *Midpiece* (*Neck and Midpiece Defects*)

Meliputi insersi kepala yang asimetris atau tidak tegak lurus, leher yang menekuk (*bent neck*), *midpiece* yang tebal atau tidak teratur, serta *midpiece* yang terlalu tipis.

3) Abnormalitas Ekor (*Tail Defects*)

Mencakup ekor yang pendek, ganda (*multiple tails*), patah, melingkar (*coiled*), atau memiliki tekukan tajam (*sharp bends*).

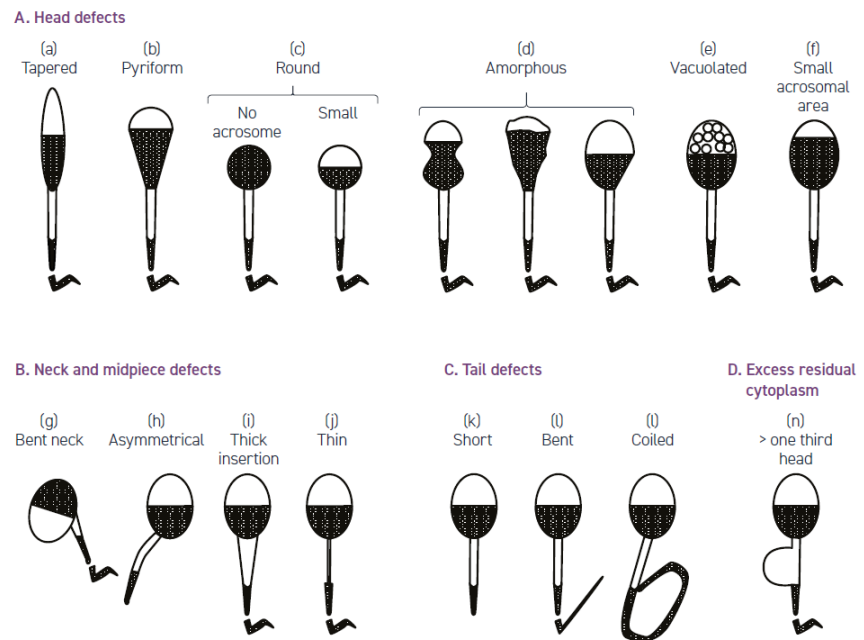
4) Residu Sitoplasma Berlebih (*Excess Residual Cytoplasm*):

Keberadaan sisa sitoplasma pada leher sperma dianggap abnormal jika ukurannya melebihi sepertiga dari ukuran kepala sperma. Hal ini sering dikaitkan dengan fungsi epididimis yang tidak optimal.

Gambaran keparahan abnormalitas didapatkan dari hasil perhitungan Indeks Teratozoospermia (TZI). TZI merupakan rata-rata jumlah cacat per spermatozoa yang abnormal, dengan nilai berkisar antara 1,00 hingga 4,00. Nilai TZI yang tinggi menunjukkan bahwa spermatozoa cenderung memiliki cacat ganda (misalnya, cacat pada kepala sekaligus ekor), yang berkorelasi dengan prognosis fertilitas yang lebih buruk (WHO, 2021a).



Gambar 1. Skema bentuk normal spermatozoa manusia (Gardner dkk., 2024)



Gambar 2. Skema beberapa bentuk abnormal spermatozoa manusia (WHO, 2021)

4. Metode Pewarnaan Morfologi Sperma

Dalam analisa morfologi spermatozoa, teknik pewarnaan memegang peranan vital karena metode yang ideal harus mampu memvisualisasikan batasan-batasan struktur sel kepala, bagian tengah (*midpiece*), dan ekor dengan jelas tanpa mengubah dimensi alami sel tersebut (Czubaszek dkk., 2019). Terdapat beberapa metode pewarnaan yang digunakan dalam pewarnaan sperma yaitu, Papanicolaou, Diff-Quik dan Safranin-Kristal Violet.

a. Papanicolaou

Pewarnaan Papanicolaou (*Pap stain*) adalah metode standar yang direkomendasikan WHO untuk analisis morfologi sperma, karena mampu memberikan kontras warna yang jelas dan detail struktur sel sperma. Prinsip utamanya adalah pewarnaan diferensial menggunakan beberapa pewarna untuk menyoroti bagian kepala, leher (*midpiece*),

dan ekor sperma, sehingga kelainan morfologi dapat diidentifikasi dengan lebih akurat. Papanicolaou menggunakan fiksasi basah dengan alkohol (etanol 95% atau campuran eter-alkohol) (Murali dkk., 2024; Sathawane dkk., 2022). Proses pewarnaan Papanicolaou ini terdiri dari beberapa tahapan dengan tujuan spesifik.

1) Fiksasi dan Rehidrasi

Proses dimulai dengan fiksasi menggunakan etanol 95% segera setelah *smear* dibuat selama minimal 15 menit. Tujuannya adalah untuk mengkoagulasi protein sel dan mencegah autolisis, sehingga morfologi sel tetap terjaga seperti kondisi aslinya. Penundaan fiksasi menyebabkan artefak pengeringan yang dapat mengganggu interpretasi morfologi, seperti penyusutan kepala sperma atau perubahan struktur kromatin. Fiksasi basah mempertahankan transparansi sel dan struktur kromatin inti, sehingga memungkinkan visualisasi vakuola dan batas akrosom yang lebih tajam dan akurat.

Setelah fiksasi, dilakukan rehidrasi bertingkat (etanol 80%, etanol 50% dan air) untuk mengembalikan kadar air ke dalam sel agar zat warna yang bersifat *aqueous* (berbasis air) seperti Hematoxylin dapat menembus membran sel.

2) Pewarnaan Inti (*Nuclear Staining*)

Pewarna Hematoxylin Harris diaplikasikan selama 4 menit untuk mewarnai materi genetik (DNA/kromatin) di dalam inti sel.

Prinsip dasarnya adalah reaksi asam-basa, di mana Hematoxylin yang bersifat basa akan berikatan dengan asam nukleat yang bersifat asam di dalam inti sel, menghasilkan warna ungu gelap atau biru.

3) Diferensiasi dan Bluing

Tahap krusial selanjutnya adalah pencelupan ke dalam alkohol asam sebanyak 4–8 kali. Ini adalah proses pewarnaan regresif yang bertujuan melunturkan kelebihan zat warna Hematoxylin dari sitoplasma dan membran, sehingga hanya inti sel yang tetap berwarna tajam. Setelah itu, sediaan dibilas dengan Larutan Scott atau air mengalir. Tahap ini disebut bluing, yang berfungsi mengubah warna inti dari ungu kemerahan menjadi biru-violet yang stabil dan kontras melalui perubahan pH menjadi basa, sementara sitoplasma menjadi bening kembali agar siap menerima pewarna pembanding (*counterstain*).

4) Pewarnaan Sitoplasma (*Counterstaining*)

Sitoplasma diwarnai dengan dua jenis zat warna yang bekerja berdasarkan ukuran molekul dan afinitas kimia.

a) Orange G-6 (OG-6)

Orange G-6 diaplikasikan selama 1 menit. Zat warna ini memiliki molekul kecil (monokromatik) yang menembus sitoplasma padat dan berikatan dengan keratin, memberi

warna oranye terang pada sel yang mengalami keratinisasi.

Pada spermatozoa, ini memberikan latar belakang kontras.

b) Eosin Azure (EA-50)

Diaplikasikan setelah dehidrasi parsial. Pewarna polikromatik (campuran Eosin Y, Light Green SF, dan Bismarck Brown). Zat warna ini membedakan aktivitas metabolik sel. Eosin Y mewarnai sitoplasma sel matang/superfisial (merah muda), sedangkan Light Green mewarnai sel yang aktif secara metabolik (hijau/biru sian). Pada sperma, ini membantu membedakan akrosom (biasanya terpulas merah muda/pucat) dari bagian pasca-akrosom dan ekor.

5) Dehidrasi dan *Clearing*

Tahap akhir melibatkan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (95% dan 100%) untuk menghilangkan seluruh molekul air dari sel. Sediaan kemudian dimasukkan ke dalam Xylene (*clearing agent*) yang memiliki indeks bias mendekati kaca. Tujuannya adalah membuat sel menjadi transparan sepenuhnya dan memungkinkan cahaya mikroskop menembus spesimen dengan optimal untuk analisis morfologi yang akurat (Fu dkk., 2025; Sathawane dkk., 2022).

b. Diff-Quik

Diff-Quik adalah metode pewarnaan sitologi cepat dan sederhana yang didasarkan pada prinsip modifikasi Romanowsky. Pewarnaan ini banyak digunakan untuk menilai morfologi sperma pada manusia dan hewan. Prinsip utamanya adalah pewarnaan diferensial komponen sel sperma menggunakan tiga larutan yaitu, fiksatif (metanol), eosin (pewarna asam, mewarnai protein dasar menjadi merah), dan thiazine (pewarna basa, mewarnai DNA menjadi biru) (Dascanio & Miller, 2021).

Pada aplikasinya menggunakan kit komersial *Sperm Stain Ready to Use* (Microptic, 2024), prosedur diawali dengan tahap fiksasi menggunakan larutan *Hexamethyl-p-rosaniline methanolic*. Sediaan dicelupkan sebanyak 5 kali dengan durasi 1 detik per pencelupan. Langkah ini berfungsi vital untuk menstabilkan struktur seluler dan mengawetkan morfologi spermatozoa agar melekat kuat pada kaca objek sebelum proses pewarnaan dimulai. Setelah fiksasi, dilanjutkan dengan Pewarnaan I menggunakan larutan *bufer Xanthene* (golongan Eosin) dengan ritme pencelupan yang sama dengan fiksasi. Eosin merupakan pewarna asam (anionik) yang secara spesifik berikatan dengan komponen sel yang bermuatan kationik atau positif, khususnya protein. Pada spermatozoa, eosin akan mewarnai struktur yang didominasi oleh protein seperti bagian ekor (*flagellum*), bagian tengah (*midpiece*), sisa sitoplasma, dan tudung akrosom sehingga bagian-

bagian tersebut tampak merah muda hingga kemerahan. Langkah berikutnya adalah Pewarnaan II menggunakan larutan *bufer Thiazine* sebanyak 5 kali pencelupan. Berkebalikan dengan eosin, pewarna basa (kationik) ini memiliki afinitas yang tinggi terhadap komponen sel yang kaya anion (bermuatan negatif), khususnya struktur asam nukleat pada inti sel. Oleh karena itu, DNA yang memadat di area belakang kepala sperma (*post-acrosomal region*) akan menyerap pewarna ini dan tampak berwarna biru tua atau ungu gelap. Perpaduan pewarna asam dan basa yang diadaptasi dari prinsip pewarnaan Romanowsky ini menciptakan kontras visual yang tajam. Rangkaian ini diakhiri dengan pembilasan menggunakan air deionisasi dan pengeringan udara (*air-drying*). Secara keseluruhan, afinitas zat warna ini akan menghasilkan visualisasi kepala, leher, dan ekor sperma berwarna violet gelap, sedangkan area akrosom tampak lebih jernih dengan warna violet pucat (Bancroft dkk., 2013; Microptic, 2024).

c. Safranin-Kristal Violet

Pewarnaan Safranin-Kristal Violet merupakan teknik pewarnaan diferensial dengan dasar zat warna gram yang dimodifikasi untuk digunakan pada sel sperma. Mekanisme pewarnaannya tidak didasarkan pada perbedaan dinding sel seperti pada bakteri, melainkan pada afinitas zat warna terhadap komponen sel dan stabilitas pH selama proses pewarnaan (Lukas, 2016).

Pada metode ini dilakukan fiksasi dengan metanol pada tahap awal. Metanol digunakan sebagai fiksatif pada tahap awal pewarnaan karena bersifat sebagai fiksatif koagulan yang mampu mendenaturasi dan mengendapkan protein secara cepat tanpa menyebabkan pembengkakan sel. Fiksasi dengan metanol berperan penting dalam mempertahankan struktur morfologi spermatozoa, meningkatkan perlekatan sel pada kaca objek, serta memfasilitasi interaksi zat warna dengan komponen sel selama proses pewarnaan differensial seperti pada metode safranin–kristal violet (Shetty dkk., 2020).

Safranin, yang dikenal sebagai Safranin-O atau *basic red 2*, merupakan zat warna basa lemah yang dapat berikatan secara reversibel dengan struktur sel non-nuklear, terutama protein sitoplasma dan bagian perifer spermatozoa. Pemberian safranin setelah proses fiksasi dengan metanol bertujuan untuk mewarnai struktur sel tanpa menyebabkan dominasi ikatan pada asam nukleat inti sperma yang memiliki muatan negatif tinggi akibat kepadatan kromatin. Zat warna safranin juga memiliki kelebihan sebagai indikator warna pada pH yang seimbang (Lukas, 2016).

Stabilisasi pH atau keasaman oleh bufer fosfat dilakukan sebanyak dua tahap setelah pewarnaan safranin dengan pH 6,8 dimana pospat sendiri adalah bahan *accentuator* mirip seperti mordant yang mampu mengikat warna sekaligus merehidarsi sel dengan hasil differensiasi warna yang baik. Pemberian kristal violet pada tahap berikutnya

memungkinkan zat warna dengan afinitas lebih kuat untuk berikatan secara selektif dengan asam nukleat inti sperma, menghasilkan diferensiasi warna yang lebih jelas dan mencegah terjadinya *overstaining* nukleus (Rahmawati Thamrin, 2024).

5. Faktor yang Memengaruhi Hasil Pemeriksaan Morfologi Sperma

Pemeriksaan morfologi spermatozoa dipengaruhi oleh faktor biologis sampel, teknis laboratorium, dan kompetensi pemeriksa, sehingga WHO menekankan pentingnya standarisasi dan pengendalian mutu untuk memperoleh hasil yang akurat (WHO, 2021).

a. Faktor Biologis Sampel

Kondisi biologis spermatozoa merupakan faktor utama yang memengaruhi hasil pemeriksaan morfologi. WHO menyatakan bahwa variasi morfologi spermatozoa dapat dipengaruhi oleh proses spermatogenesis, kondisi fisiologis individu, serta adanya kelainan pada semen seperti leukositospermia atau gangguan likuifaksi. Variasi biologis ini menyebabkan perbedaan bentuk kepala, leher, dan ekor spermatozoa yang dapat memengaruhi proporsi morfologi normal yang diamati (WHO, 2021). Selain itu, WHO menekankan bahwa pemeriksaan morfologi sebaiknya dilakukan pada sampel semen yang telah mengalami likuifaksi sempurna dan memiliki jumlah spermatozoa yang memadai agar evaluasi morfologi dapat dilakukan secara representatif.

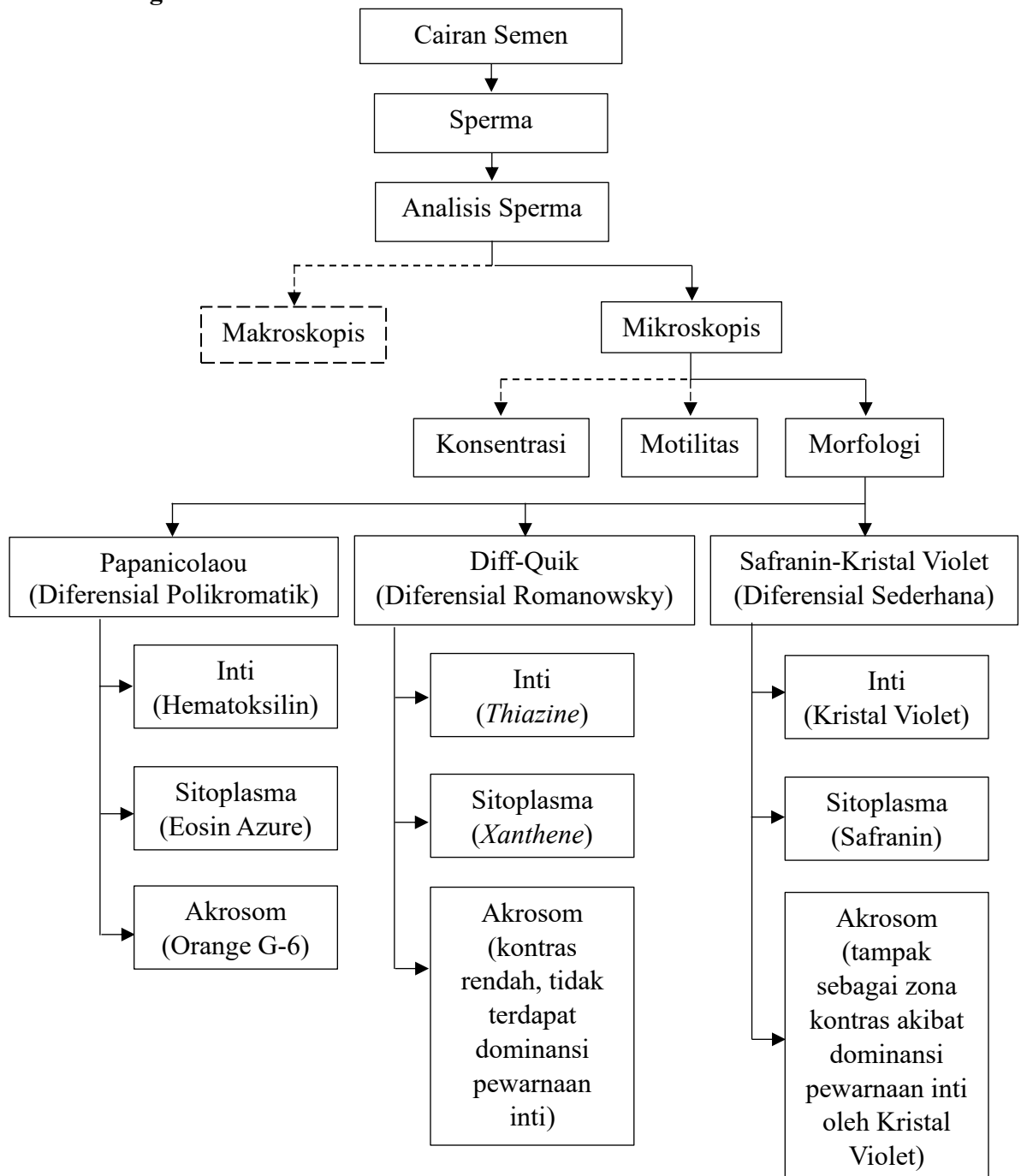
b. Faktor Teknis Laboratorium

Faktor teknis laboratorium berperan penting dalam menentukan kualitas hasil pemeriksaan morfologi spermatozoa. WHO menyebutkan bahwa pembuatan sediaan apus yang baik, ketebalan apusan yang sesuai, serta proses fiksasi yang tepat sangat memengaruhi visualisasi struktur spermatozoa. Apusan yang terlalu tebal atau tidak homogen dapat menyulitkan identifikasi morfologi secara akurat. Metode pewarnaan juga merupakan faktor penting dalam pemeriksaan morfologi. Perbedaan metode pewarnaan dapat menghasilkan perbedaan intensitas warna dan kejelasan struktur sel, yang pada akhirnya dapat memengaruhi hasil penilaian morfologi spermatozoa (WHO, 2021).

c. Faktor Pemeriksa

Pemeriksaan morfologi spermatozoa sangat bergantung pada keterampilan dan pengalaman pemeriksa. Penilaian morfologi bersifat subjektif sehingga dapat terjadi variasi antar pemeriksa maupun intra-pemeriksa. Oleh karena itu, WHO menekankan pentingnya pelatihan, standarisasi kriteria penilaian, serta penerapan pengendalian mutu internal untuk meminimalkan variasi hasil pemeriksaan (WHO, 2021). Penggunaan kriteria morfologi yang seragam serta pembacaan sediaan secara konsisten oleh pemeriksa yang terlatih merupakan langkah penting untuk meningkatkan reliabilitas hasil pemeriksaan morfologi spermatozoa.

B. Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori

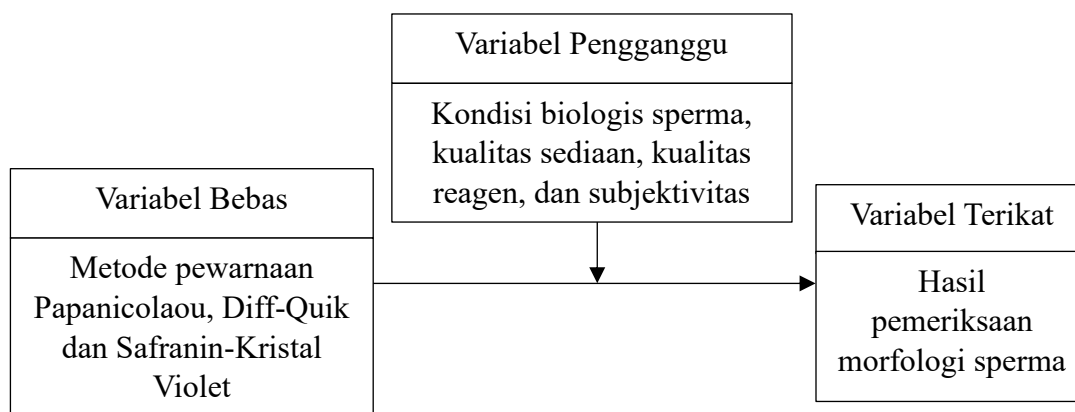
Keterangan :

: Diteliti

: Tidak diteliti

C. Hubungan Antar Variabel

Metode pewarnaan spermatozoa merupakan variabel bebas yang memengaruhi hasil pemeriksaan morfologi spermatozoa, khususnya persentase morfologi normal sebagai variabel terikat. Perbedaan metode pewarnaan dapat menghasilkan kejelasan dan kontras struktur morfologi yang berbeda sehingga berpotensi memengaruhi hasil penilaian. Selain itu, faktor lain seperti kondisi biologis sampel, kualitas sediaan apus, dan subjektivitas pemeriksa berperan sebagai variabel pengganggu. Variabel pengganggu tersebut dapat dikendalikan melalui desain penelitian berpasangan, kriteria inklusi dan eksklusi, prosedur operasional standar, serta pembacaan sediaan secara *blind reading* oleh enumerator terlatih.



Gambar 4. Hubungan antar variabel

D. Hipotesis

Ada perbedaan hasil pemeriksaan morfologi sperma menggunakan metode pewarnaan Papanicolaou, Diff-Quik dan Safranin-Kristal Violet.