

## Mini review

# Peran Uji Kapasitas Membuahi Sperma Berdasarkan Enzim Akrosin dan Uji Kondensasi Kromatin Sperma dengan Metoda Halosperm pada Pria Infertilitas Sebelum Dilakukan Teknologi Reproduksi Berbantuan

### Eldafira

Departemen Biologi Kedokteran,  
Fakultas Kedokteran, Universitas  
Indonesia  
Jakarta

Penulis korespondensi:  
Dr. Dra. Eldafira, M.Si.  
Departemen Biologi Kedokteran,  
Fakultas Kedokteran,  
Universitas Indonesia  
Jl. Salemba Raya No. 6,  
Jakarta 10430, Indonesia.  
E-mail: eldafira96@yahoo.com

### ABSTRAK

Banyak kasus pria infertilitas dengan kategori plasma semen normal, namun belum mampu membuahi sel telur pasangannya. Hal tersebut menjelaskan bahwa sperma dengan hasil pemeriksaan analisa semen rutin normal, dengan metoda reproduksi berbantuan (IVF/*in vitro fertilization*) masih banyak gagal. Kegagalan pria yang belum berhasil membuahi sel telur pasangannya tersebut dapat disebabkan oleh banyak faktor. Hasil pemeriksaan analisa semen rutin secara mikroskopis ataupun makroskopis belum sepenuhnya menjawab permasalahan terhadap pria infer-tilitas. Gangguan pada sperma dapat bersifat seluler ataupun enzimatik tidak terdeteksi dari hasil pemeriksaan analisa semen rutin. Pemeriksaan rutin analisa semen di lab andrology perlu ditambahkan dengan uji lanjut terhadap kemampuan membuahi sperma. Uji lanjut ini dilakukan bermanfaat bagi pasien infertilitas yang ingin melakukan program IVF konvensional dengan tujuan untuk mengurangi faktor kegagalan dalam proses pembuahan. Berbagai uji lanjut terhadap kemampuan sperma dalam membuahi sel telur telah banyak dilakukan dewasa ini.

Pemeriksaan uji lanjut sperma terhadap pasien infertilitas yang melakukan fertilisasi berbantuan (IVF konvensional/ ICSI=injeksi sperma intrasitoplasmik) belum sepenuhnya dilakukan. Berdasarkan permasalahan tersebut untuk meningkatkan pemeriksaan pelayanan pada masyarakat di bidang Andrologi, selain pemeriksaan rutin Analisa Semen perlu ditambahkan pemeriksaan lanjut untuk hasil yang lebih bermakna dari sisi seluler atau enzimatik yaitu: 1) Menentukan gangguan aktivitas enzim akrosin dengan metoda penentuan persentase "pengamatan HALO" pada sperma. Sperma membentuk "HALO" mengindikasikan kegiatan enzim akrosinnya normal, sebaliknya sperma yang tidak menunjukkan adanya "HALO" berarti aktivitas enzim akrosin terganggu. 2) Menentukan gangguan kondensasi kromatin sperma dengan menggunakan pewarnaan asam *aniline blue* terhadap pasien infertilitas. Pemeriksaan sperma dengan *aniline blue* mengindikasikan bahwa sperma yang tidak menyerap warna biru menunjukkan kondensasi kromatin sperma normal sebaliknya sperma yang menyerap warna biru menunjukkan adanya gangguan kondensasi. Kedua uji dapat dilihat dengan tehnik fluoresensi pewarnaan DAPI atau FISH (*fluoresensi in situ hybridization*). Hasil pemeriksaan uji lanjut sperma tersebut dilengkapi dengan pemeriksaan analisa semen rutin pada pasien infertilitas.

**Kata kunci:** kondensasi kromosom, akrosim, infertilitas.

### PENDAHULUAN

Teknologi reproduksi berbantuan (*assisted reproductive technology, ART*), disingkat TRB, adalah teknologi yang digunakan untuk mendapatkan kehamilan dengan menggunakan prosedur seperti pengobatan fertilitas, fertilisasi *in vitro* ("bayi tabung"/IVF) dan surogasi. Teknologi reproduksi terutama digunakan untuk

perawatan infertilitas atau ketidaksuburan, dan juga dikenal sebagai "perawatan fertilitas". Teknologi tersebut secara khusus termasuk dalam bidang infertilitas dan endrokrinologi reproduksi, meliputi injeksi sperma intrasitoplasmik (ICSI) dan kriopreservasi. Beberapa bentuk TRB juga digunakan dengan melibatkan pasangan subur karena alasan genetik (diagnosis genetik praimplantasi). TRB juga digunakan pada pasangan yang karena penyakit menular tertentu; HIV misalnya untuk mengurangi risiko infeksi apabila kehamilan diinginkan. (Sumber: Wikipedia, 2022)

### Fertilisasi in vitro, Etika dan Surogasi

Sejumlah pasangan merasa sulit untuk menghentikan perawatan yang dilakukan meski prognosinya sangat buruk, sehingga berakhir pada kesia-siaan. Kegagalan IVF yang dialami pertama kali, untuk keputusan kedua kalinya akan sulit bagi pengguna TRB apakah akan melanjutkan atau menolak perawatan. (Van Voorhis *et al.*, 2007)

Sejumlah teknologi reproduksi berbantuan sebenarnya dapat membahayakan sang ibu maupun anaknya. Terdapat risiko kesehatan fisik dan juga psikologis, yang dapat berdampak pada pelaksanaan perawatan yang sedang berlangsung. Semua efek yang merugikan dapat mengakibatkan kekhawatiran dan seharusnya diatur secara ketat agar kandidat yang tidak siap secara fisik maupun mental tidak diperkenankan untuk menjalani perawatan. (Kuringzuk *et al.*, 2004). Permasalahan IVF yang masih banyak bertentangan dengan agama dan budaya masyarakat antara lain: bank sperma, inseminasi buatan, kloning manusia, tanggapan keagamaan terhadap teknologi reproduksi berbantuan.

### Peran analisis molekuler sebelum IVF

Pemeriksaan laboratorium analisa semen rutin secara makroskopis dan mikroskopis terhadap pasien infertilitas, belum cukup menjawab semua permasalahan pada kasus-kasus pria infertilitas. Oleh karena itu perlu dilakukan pemeriksaan yang dilengkapi dengan parameter lain agar penentuan kualitas semen lebih membantu diagnosis yang mau ditegakkan oleh ahli medis. Hal tersebut disebabkan pemeriksaan lab analisa semen rutin pada pasien infertilitas dengan kriteria sperma "normozoospermia", dalam fakta dan realitanya masih banyak yang belum berhasil mempunyai keturunan (idiopathic).

Pasien infertilitas yang ingin mempunyai keturunan dengan menggunakan program IVF (tehnologi reproduksi berbantuan) perlu menjalani uji lanjut pemeriksaan sperma dengan uji melihat kemampuan sperma dalam membuahi sel telur terlebih dahulu. Pemeriksaan lanjut ini sangat bermanfaat dan bertujuan untuk mengurangi faktor kegagalan seminimal mungkin dalam proses bayi tabung. Sering kejadian kegagalan disebabkan karena sebelum proses bayi tabung dilakukan, belum sepenuhnya diketahui kelemahan disisi sperma secara molekuler

Banyak cara telah berkembang dewasa ini untuk menguji kemampuan sperma membuahi sel telur secara: biokemis, seluler ataupun molekuler. Salah satu uji fungsi sperma yang dianggap penting untuk dilakukan dalam pemeriksaan analisa semen lanjut adalah menentukan gangguan fungsi akrosom dengan melihat aktivitas enzim akrosin. Uji ini dapat merupakan suatu parameter diagnosis penting dalam menentukan kelainan kesuburan pada pria (Schill WB. 1999)

Penentuan akrosin adalah salah satu penandaan dengan menentukan enzim spesifik yang terbaik pada sperma, karena pendekatan ini cocok untuk mengevaluasi kemampuan membuahi spermatozoa manusia. Penentuan akrosin diperlukan untuk pasien yang melakukan IVF secara konvensional. Akrosin adalah proteinase serin menyerupai tripsin yang terdapat banyak di daerah akrosom spermatozoa dewasa mamalia.

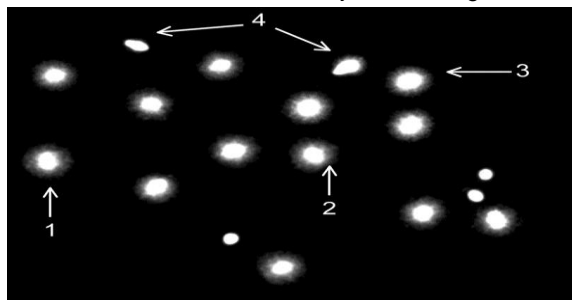
Enzim akrosin berperan penting dalam penetrasi zona pelusida melalui proteolysis protein-protein zona. Fungsi lain dari enzim ini adalah dalam kemampuannya berikatan pada zona pelusida. Selain itu akrosin juga terlibat dalam kapasitas dan reaksi akrosom. Akrosin juga dapat merangsang perpindahan sperma intra-uterin saat pembebasan dari akrosom sperma mati. Akrosin mampu meliberasi kinin dari kinogen, sedangkan kinin meningkatkan metabolisme dan motilitas sperma (Schill WB, 1999)

Menentukan keabnormalan aktivitas enzim akrosin dapat dilakukan dengan metoda proteolytic potensial spermatozoa pada plate gelatin. Akrosin dibebaskan dengan keluarnya hyper-osmopolaritic dari akrosom yang cenderung membentuk 'halo'selama ikubasi dalam ruang suhu ruang 37<sup>0</sup> C. Pembentukan "HALO" (Gambar 1) tampak dominan pada spermatozoa hidup dan berkorelasi dengan uji eosin, sedangkan spermatozoa mati pembentukan "halo" lebih

rendah. Metoda gelatinolisis ini sangat menguntungkan, karena peralatannya sangat sederhana dan kegiatan akrosin dapat ditentukan pada individual spermatozoa (Schill, 1999).

Percobaan gelatinolisis ini yang mana spermatozoa manusia disebarkan pada slide yang telah dilapisi gelatin, setelah itu diinkubasi selama dua jam pada suhu 37<sup>o</sup> C di ruang yang lembab. Tampak bahwa spermatozoa dengan diameter "HALO" >10µm. Kondosi tersebut menunjukkan kegiatan akrosin normal. Spermatozoa dengan diameter <10µm kondisi menunjukkan terjadi penurunan kegiatan akrosin. Sedangkan spermatozoa yang tidak menunjukkan "HALO" tidak ada kegiatan akrosinnya.

[https://onlinelibrary.wiley.com/cms/asset/5320019c-8037-44c3-98cb-1278dbc4f7c0/jand\\_53\\_f1.gif](https://onlinelibrary.wiley.com/cms/asset/5320019c-8037-44c3-98cb-1278dbc4f7c0/jand_53_f1.gif)



Gambar 1. Uji penyebaran kromatin sperma: sperma dengan ukuran HALO yang berbeda. Nukleus dengan ukuran HALO besar hingga kecil, menunjukkan DNA sperma yang tidak terfragmentasi, dan nucleus yang tidak ada HALO menunjukkan DNA sperma yang terfragmentasi. Yang ditunjuk panah 1) HALO besar, 2) HALO sedang, 3) HALO kecil, 4) tidak ada HALO. Gambar asli pewarnaan DAPI, dicetak dengan warna abu-abu (Chohan, 2005).

Kegiatan enzim akrosin rendah sering ditemukan pada pasien infertilitas dengan kondisi sperma teratozoospermia dan polyzoospermia yaitu rata-rata <60%. Hasil studi melaporkan bahwa penentuan akrosin adalah parameter yang bermanfaat untuk memprediksi potensial pembuahan oleh spermatozoa. Keadaan infertilitas pria merupakan gambaran terjadinya berbagai keabnormalan pada nucleus spermatozoa antara lain: keabnormalan struktur kondensasi kromatin, kromosom dengan mikrodelesi, kromosom dengan uneuploidi, dan kerusakan pita DNA.

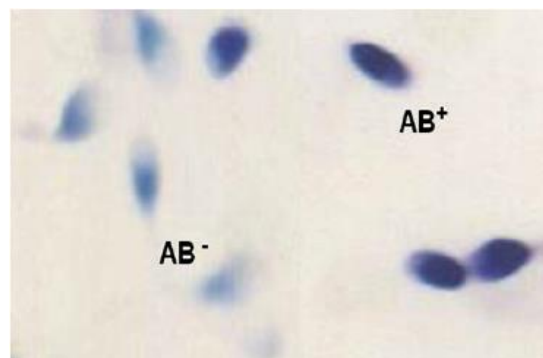
Salah satu uji fungsi sperma secara seluler adalah menentukan kelainan kondensasi kromatin sperma. Protein nuclear berperan penting dalam proses dekondensasi kromatin sperma. Struktur kromatin sperma dari kualitas sperma yang rendah dapat merupakan indikasi

dari kasus subfertilitas pria (Chohan *et al.*, 2006 & Agarwal, 2004).

Keabnormalan kromatin nukleus sperma dapat terjadi saat pengemasan DNA pada waktu spermiogenesis. Selama spermiogenesis protein histon yang penuh dengan lisin secara normal digantikan oleh protamin. Proses ini merupakan persiapan dalam proses dekondensasi kromatin saat pembentukan pronukleus pria dalam membuahi oosit. Kasus gangguan pada proses dekondensasi kromatin, kemungkinan histon-histon tetap bertahan dan tidak digantikan oleh protamin. Kondisi histon tersebut dapat ditentukan dengan pewarnaan asam *aniline blue*. Metoda tersebut dapat membedakan antara pria infertilitas dan yang diduga infertilitas dengan menggunakan tingkat kematangan nuklear sebagai parameter.

Kasus spermatozoa yang positif *anilin blue* dengan nilai >50%, kondisi ini menunjukkan bahwa terjadi kerusakan pada gen protamin. Menurut Dadoune *et al.*, (1988) & Hofmann *et al.*, (1991) bahwa ejakulasi normal mengandung sedikitnya 75% sperma tidak berwarna. Hal tersebut menunjukkan bahwa kondensasi kromatin sperma normal. Spermatozoa dengan kondisi menyerap warna biru menunjukkan terganggunya proses kodensasi kromatin.

Hasil studi menunjukkan bahwa kondensasi kromatin normal menginduksi terjadi fertilisasi. Dengan demikian pewarnaan anilin blue sangat prediktif dan dapat digunakan sebagai uji laboratorium yang seharusnya dilakukan sebelum menggunakan semua metoda reproduksi berbantuan. Meskipun nilai tersebut terbatas untuk prosedur IVF konvensional, namun mempelajari prediksi kondensasi kromatin pada spermatozoa yang gagal menggunakan IVF-ICSI, pada tahap lanjut perlu dilakukan uji kemampuan sperma untuk membuahi sel telur.



Gambar 2. Metoda evaluasi kerusakan DNA sperma menggunakan pewarnaan aniline blue. Kepala sperma berwarna biru terang menunjukkan DNA normal dan kepala sperma berwarna biru gelap me-

nunjukkan kerusakan pada DNA sperma (Nabi A, 2013).

Gangguan kondensasi kromatin sperma sering dikombinasikan dengan kerusakan akrosom (Schill WB. 1999). Menurut Agarwal (2004) bahwa tingkat keberhasilan pembuahan melalui ICSI tidak melebihi 65-80%. Keberhasilan pembuahan lebih rendah dari pada kemungkinan yang diharapkan, karena disebabkan oleh faktor sperma yang terpilih dari semen pasien infertilitas mempunyai kerusakan pada DNANYa. Oleh karena itu meskipun umumnya tampak normal dan spermatozoa yang terpilih adalah motil dengan persentase jumlah spermatozoa sedikit, jika kondisi tersebut digunakan untuk IVF/ICSI, namun sperma tersebut mengandung berbagai tingkat kerusakan pada DNANYa

Sampel semen yang ditandai dengan kerusakan fragmentasi meningkat berhubungan dengan penurunan tingkat pembuahan ataupun kegagalan pada pertumbuhan awal embrio (cleavage) hingga menyebabkan kematian embrio. Agarwal (2004) melaporkan bahwa, terdapat korelasi kerusakan DNA sperma dengan keberhasilan pembuahan dimana indeks fragmentasi DNA lebih tinggi secara signifikan, pada pria infertilitas yang mana tidak terjadi kehamilan dari pasien yang mengikuti ICSI/IVF. Selain itu juga dilaporkan bahwa tidak terjadi kehamilan apabila indeks fragmentasi DNA lebih tinggi dari 28%. Dengan demikian menentukan kromatin sperma pada pasien infertilitas dapat membantu memprediksi keberhasilan kehamilan pada pasien yang mengikuti teknik bayi tabung IVF/ICSI.

### Faktor Risiko

Bayi yang dikandung menggunakan metode IVF ("bayi tabung") tidak memiliki kelainan bawaan atau cacat lahir (Van Voorhis *et al.*, 2007). Hasil penelitian ditemukan realita bahwa teknologi reproduksi berbantuan meningkatkan risiko cacat lahir (Kuringzuk *et al.*, 2004 & Hansen, 2005). Penelitian dengan skala terluas di Amerika Serikat, yang menggunakan data registrasi cacat lahir dari seluruh negara bagian Olson' (2005) menyatakan bahwa 6,2% anak yang dikandung dengan IVF memiliki cacat besar, dibandingkan dengan 4,4% anak yang dikandung secara alami menggunakan kesesuaian data usia maternal dan faktor lainnya (rasio peluang 1,3; interval kepercayaan 95%, 1,00-1,67) (Van Voorhis *et al.*, 2007). Teknologi reproduksi berbantuan (TRB) disertai dengan risiko mengalami kehamilan heterotopik (keha-

milan di luar rahim dan di dalam rahim) secara bersamaan (Daniel *et al.*, 2016)

### Faktor risiko utama

Faktor resiko utama termasuk; kelainan genetik, berat lahir rendah, kelahiran prematur. Rendahnya berat badan bayi saat kelahiran dan kelahiran prematur sangat erat hubungannya dengan banyak masalah kesehatan, misalnya gangguan penglihatan dan kelumpuhan otak (*cerebral palsy*). Anak-anak yang dilahirkan menggunakan metode IVF diperkirakan dua kali lebih mungkin menderita kelumpuhan otak (Hvidtjom *et al.*, 2009). Pada metode IVF dan ICSI, salah satu faktor risiko yaitu penurunan ekspresi protein dalam metabolisme energi rantai ringan Feritin dan ATP5A1 (Zhangz *et al.*, 2008).

### Faktor risiko lain

Kerusakan membran, dapat tercermin dari peningkatan ekspresi protein fusi membran NAPA dan Annexin A3 (Zhangz *et al.*, 2008). Data saat ini menunjukkan bahwa terdapat sedikit atau tidak ada peningkatan risiko depresi pasca persalinan di antara para wanita yang menggunakan TRB (Ross *et al.*, 2010). Penggunaan teknologi reproduksi berbantuan seperti stimulasi ovarium dan fertilisasi *in vitro* diasosiasikan, dengan peningkatan risiko keseluruhan kanker pada anak dalam keturunan yang dihasilkan, yang mungkin disebabkan oleh penyakit awal yang sama ataupun kondisi yang menyebabkan infertilitas atau subfertilitas pada sang ibu atau sang ayah (Ross *et al.*, 2010)

### Penggunaan Tehnologi Reproduksi Berbantuan

Prosedur-prosedur teknologi reproduksi dengan bantuan yang dilakukan di Amerika Serikat dilaporkan meningkat dua kali lipat selama 10 tahun terakhir, dengan 140.000 prosedur yang dilakukan pada tahun 2006 menghasilkan 55.000 kelahiran, (*chicagotribune.com*, 2010). Di Australia, dikabarkannya bahwa 3,1% kelahiran merupakan hasil TRB (*More IVF babies but less multiple births*, 2009).

Beberapa alasan-alasan dalam kasus penghentian perawatan fertilitas untuk melanjutkan program IVF antara lain diperkirakan adalah: penundaan perawatan (39%), beban psikologis maupun fisik (19%), beban psikologis (14%), beban fisik (6,32%), masalah pribadi maupun relasional (17%), masalah pribadi (9%), masalah relasional (9%), penolakan terhadap

perawatan (13%), serta masalah-masalah pada organisasi (12%) dan klinik (8%). (Gameiro *et al.*, 2012)

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003; 9(4): 331-45.
2. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006; 27(1): 53-9.
3. Chicagotribune.com Infertility by Numbers. Diarsipkan 2009-07-05 di Wayback Machine. Colleen Mastony. June 21, 2009.
4. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 1988; 20: 211-7.
5. Ethics Committee of the American Society for Reproduction Medicine. Fertility treatment when the prognosis is very poor of futile. *Fertil Steril*. 2009;92(4):1194-7 doi 10.1016/j.fertnstert.07.979. PMID 1972 6040.
6. Gameiro S, Boivin J, Peronace L, Verhaak CM. Why do patients discontinue fertility treatment? A systematic review of reasons and predictors of discontinuation in fertility treatment. *Hum Reproduction Update*. 2012;18(6):652-69. Doi.10.1093/humupd/dms031. PMC 3461967. PMID. 22869759
7. Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects-systematic review. *Hum Reprod*. 2005; 20(2): 328-38. Doi.10: 1093/humrep/deh593. PMID15567881
8. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to access chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod*. 1991;6:979- 82.
9. Hargreave M, Jensen A, Toender A, Andersen KK, Kjaer SK. Fertility treatment and childhood cancer risk: A systematic meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;100(1):150-61. doi. 10.1016/j.fertnstert. 2013 03 017. PMID 23562045
10. Hvidtjom D, Schieve L, Schendel D, Jacobsson B, Svaerke C, Thorsen P. Cerebral palsy, autism spectrum disorder, and developmental delay in children born after assisted conception a systematic review and meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009;163 (1): 72-83. doi. 10.1001/archpediatrics.2008.507. PMID 19124707
11. Ichikawa T, Oeda T, Ohmori H, Schill WB. Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. *Int J Androl*. 1999;22(1):37-42. DOI: 10.1046/j.1365-2605.1999.00145.X. PMID: 10068942.
12. Kurinczuk JJ, Hansen M, Bower C. The risk of birth defects in children born after assisted reproductive technologies. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2004; 16(3):201-9. Doi: 10.1097/00001703-200406000-00002. PMID15129049
13. More IVF babies but less multiple births. Diarsipkan 2009-09-24. The Australian September 24. 2009.
14. Avery DM, Reed MD, Lenahan WL. What you should know about heterotropic pregnancy: OBG Management. 2009;21:30-4. www.obgmanagement.com. Diakses tgl 2016-07-28.
15. Noah L. Assisted reproductive technologies and pitfalls of unregulated biomedical innovation. *Fla Law Rev*. 2003;55(2):604-9.
16. Nabi A, Khalili MA, Halvaei I, Ghasemzadeh J, Zare E. Seminal bacterial contaminations. Probable factor in unexplained recurrent pregnancy loss. *Iran J Reprod Med*. 2013; 11(11): 925-32.
17. Olson CK, Keppler -Noreuil KM, Romiti PA, Budelier WT, Ryan G, Sparks AE, Van Voorhis BJ. In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects. *Fertil Steril*. 2005;84(5):1308-15. DOI. 10.1016/j.fertnstert 2005.03.086 PMID 16275219
18. Ross LE, McQueen K, Vigod S, Dennis CL. Risk for postpartum depression associated with assisted reproductive technologies and multiple births. A systematic review. *Hum Reprod Update*. 2010;17(1):96-106. doi: 10.1093/humupd/dmq025. PMID 20605900
19. Schill, Wolf-Bernhard, Ralf Henkel. Advancement in biochemical assays in andrology. *Asian J Androl*. 1999; 1: 45-51.
20. Van Voorhis BJ. Clinical Practice in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2007;356 (4):379-86. Doi: 10.1056/NEJMcp06574. PMID 17251534

21. Zhangz Y, Zhang YL, Feng C, Wu YT, Liu AX, Sheng JZ, *et al.* Comparative proteomic analysis of human placenta derived from

assisted reproductive technology. *Proteomic.* 2008;8(20):4344-56. Doi. 10.1002/pmic.200800294. PMID 1879 2929.