

## **Perbandingan Hasil Pemeriksaan Morfologi Spermatozoa Manusia Menggunakan Metode Pewarnaan Papanicolaou, Diff Quik, Dan Safranin-Kristal Violet Pada Pasien Infertil di Klinik Telkomedika Ratulangi Makassar**

*Comparison of Human Spermatozoa Morphology Examination Results Using Papanicolaou, Diff Quik, and Safranin-Crystal Violet Staining Methods in Infertile patients at Telkomedika Ratulangi Clinic Makassar*

**Rahmawati Thamrin<sup>1\*</sup>, Hengky Lukas<sup>2</sup>**

\*Email: rahmawati.thamrin@gmail.com

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Bosowa

<sup>2</sup>Rumah Sakit Umum Daerah Sidoarjo

Diterima: 03 Januari 2024/Disetujui: 30 April 2024

### **ABSTRAK**

Pemeriksaan sperma sangat penting dalam mengetahui masalah kesuburan pada pria. Dalam pemeriksaan sperma terdapat pemeriksaan utama yaitu konsentrasi, motilitas dan morfologi. Penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan metode pemeriksaan morfologi pada Analisa sperma yaitu metode Papanicolaou, Safranin, dan Diff Quik dalam mengevaluasi morfologi sperma untuk mendapatkan hasil terbaik dalam menilai infertilitas pria. Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian laboratorium observasional analitik yang dilakukan pada pasien yang datang ke Klinik Telkomedika pada bulan September 2019 – Januari 2020. Penelitian meneliti morfologi spermatozoa dari pada pasien infertil dan diperiksa dengan 3 metode: Papanicolaou, Safranin dan Diffquik lalu dibandingkan. Hasilnya, total pasien yang diperiksa morfologi spermanya dengan Safranin dan Diffquik selama lima bulan di Klinik Telkomedika dari bulan September 2019 hingga Januari 2020 sebanyak 90 orang diambil spermanya dan diperiksa morfologi spermanya dengan Metode Papanicolaou, Safranin dan Diffquik. Hasil analisis statistik menemukan bahwa terdapat signifikansi antara dua metode yang kami uji. Pada kategori panjang dan lebar terdapat perbedaan bermakna  $p < \alpha$  antara Diffquik-Safranin Crystal Violet dan Diffquik-Papanicolaou. Hal serupa juga terjadi pada kategori vakula, melintang, bagian tengah, dan ERC. Pada metode ketiganya menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hasil studi menyarankan evaluasi morfologi spermatozoa yang paling tepat adalah dengan menggunakan Safranin Crystal Violet.

**Kata Kunci:** Spermatozoa, Pewarnaan, Papanicolaou, Diff Quik, Safranin-Kristal Violet, Pasien Infertil

### **ABSTRACT**

*Sperm examination is very important in finding out fertility problems in men. In sperm examination, there are main examinations, namely concentration, motility and morphology. This study is to determine the difference in morphological examination methods in sperm analysis, namely Papanicolaou, Safranin, and Diff Quik methods in evaluating sperm morphology to get the best results in assessing male infertility. The research design used was analytical observational laboratory research conducted on patients who came to the Telkomedika Clinic in September 2019 - January 2020. The study examined the morphology of spermatozoa from infertile patients and examined with 3 methods: Papanicolaou, Safranin and Diffquik and then compared. As a result, a total of 90 patients who were examined for sperm morphology with Safranin and Diffquik for five months at the Telkomedika Clinic from September 2019 to January 2020 had their sperm taken and examined for sperm morphology using the Papanicolaou, Safranin and Diffquik methods. The results of statistical analysis found that there was significance between the two methods we tested. In the length and width categories, there was a significant difference of  $p < \alpha$  between Diffquik-Safranin Crystal Violet and*

*Diffquik-Papanicolaou. The same was true for the vacuoles, transverse, central, and ERC categories. All three methods showed significant differences. The study results suggest that the most appropriate evaluation of spermatozoa morphology is by using Saffranin Crystal Violet.*

**Keywords:** *Spermatozoa, Staining, Papanicolaou, Diff Quik, Safranin-Crystal Violet, Infertile Patients*



This work is licensed under Creative Commons Attribution License 4.0 CC-BY International license

## A. PENDAHULUAN

Semen analisis rutin adalah metode pemeriksaan pada infertilitas pria, dimana terdapat beberapa parameter penting seperti konsentrasi, motilitas dan morfologi yang pada umumnya diakui sebagai tiga parameter penting yang akan dinilai disamping parameter lainnya. Parameter ini dianggap paling berguna karena telah terbukti menunjukkan potensi kesuburan. Dari semua parameter analisis semen rutin tersebut, morfologi spermatozoa menjadi salah satu yang indikator paling kuat dari potensi kesuburan seorang pria (Gravance et al. 1998, WHO 1999, Henkel et al. 2007, van der Horst et al. 2009).

Morfologi spermatozoa penting untuk mencapai kesuksesan fertilisasi (Kuster et al., 2004). Kriteria Kruger pada tahun 1986 dan klasifikasi WHO bahwa morfologi berpengaruh sejak spermatozoa mengalami maturasi hingga melaksanakan fungsinya saat fertilisasi. Morfologi yang normal biasanya pada kepala spermatozoa mengandung nucleus yang terdiri dari DNA dan RNA juga terdapat lipid, mucoprotein, magnesium dan garam

lainnya. Begitu pula pada leher serta ekor spermatozoa yang memiliki komposisi lipid, garam kalium, kalsium dan garam lainnya sebagai struktur penyusun spermatozoa (moeloek,1983). Morfologi normal tersebut pada umumnya didapati pada pasien fertil, pada pasien infertil sering dijumpai morfologi abnormal (Gravance et al. 1998). Untuk menilai normal atau tidaknya morfologi spermatozoa, pada laboratorium Andrologi menggunakan beberapa metode pewarnaan.

Pewarnaan yang baik akan menghasilkan interpretasi morfologi yang baik pula. Keakuratan penilaian morfologi sperma tergantung pada persiapan yang cermat, fiksasi, dan pewarnaan sperma (GARCI'a-Herreros et al. 2006), karena prosedur ini dapat mempengaruhi dimensi sperma secara signifikan (Meschede et al. 1993, Gago dkk. 1998, Hidalgo et al. 2006, Lukaszewicz et al. 2008). Pada spermatozoa normal yang banyak dijumpai pada pasien fertil yang dimana strukturnya bagus dengan komposisi seperti lipid, mucoprotein, garam-garam (Mg, Fe, Cu, K dan fosfat) yang utuh (van

dweye, 1954), akan memungkinkan dapat terwarnai dengan sempurna daripada spermatozoa abnormal yang terdapat pada pasien pria infertil yang kemungkinan ada kerusakan pada bentuk spermatozoa yang mengakibatkan komposisi tidak lengkap. Ada banyak metode pewarnaan antara lain Papanicolaou, Diff-Quik, Safranin-Kristal Violet untuk pewarnaan spermatozoa. Metode yang digunakan dalam pewarnaan dapat menyebabkan sedikit perubahan dalam nilai-nilai pengukuran spermatozoa misalnya proses fiksatif dapat menyebabkan sel menyusut sedikit. Nilai-nilai ini berubah menjadi 5-6  $\mu\text{m}$  (panjang) dan 2,5  $\mu\text{m}$  - 3,5  $\mu\text{m}$  (lebar) pada Metode pewarnaan Diff-Quik. (Irez et al., 2007). Prosedur pada metode Diff-Quik memerlukan kurang dari 5 langkah sederhana dan hanya melibatkan 3 larutan, sedangkan prosedur metode Safranin-Kristal Violet hanya memerlukan 4 larutan dengan 5 langkah sederhana. (Ross 1953, Katz et al. 1986). Pada metode Diff-Quik, mengandung fast green 0,002 g/l dalam methanol sebagai bahan fixatif, eosin Y 1,22g/l dalam phosphate buffer dengan pH 6,6 sebagai bahan pewarna yang biasanya akan mewarnai sitoplasma dengan sempurna dan 0,1% sodium azide sebagai preservative, thiazine dye 1,1g/l didalam phosphate buffer pH 6,6 yang memiliki

kelebihan dimana lebih sederhana dan lebih cepat dalam proses pengerjaannya. Pada metode Safranin-Kristal Violet, pewarna safranin digunakan sebagai counterstain dan Kristal violet bereaksi dengan cara memisahkan ion dalam larutan air ke dalam Ion CV + dan klorida (Cl<sup>-</sup>). Ion ini menembus dinding sel dan membran sel, ion CV + berinteraksi dengan komponen bermuatan negatif sehingga memberi warna ungu pada sel tersebut. Counterstain, yang biasanya bermuatan positif (safranin) akan memberikan decolorized pink.

Sampai saat ini, masih kurang penelitian yang membandingkan hasil penilaian morfologi spermatozoa menggunakan metode Diff-Quik dan metode Safranin-kristal violet pada morfologi normal yang pada umumnya ditemukan pada pria fertil dan morfologi abnormal yang pada umumnya ditemukan pada pasien pria infertil.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui perbedaan metode pemeriksaan morfologi pada Analisa sperma yaitu metode Papanicolaou, Safranin, dan Diff Quik dalam mengevaluasi morfologi sperma untuk mendapatkan hasil terbaik dalam menilai infertilitas pria.

## B. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional analytic laboratorium. Rancangan penelitian ini menggunakan metode Komparatif dengan menggunakan analisis varian atau Anova. Subyek dilakukan untuk membandingkan metode papanicolaou, metode diffquik dan metode saffranin kristal violet untuk analisis morfologi spermatozoa.

## C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang telah terkumpul mempunyai rentang umur antara 21 – 40 tahun. Abstinensia minimal 2 dan maksimal 7 hari. Seluruh sampel sperma diperoleh secara masturbasi dan lengkap.

Sampel sperma pria fertil dan pasien pria infertil yang datang berobat ke Klinik klinik Telkomedika, Makassar bulan September 2019 – januari 2020 didapatkan 45 sampel. Hasil analisis sampel sperma pasien tersebut didapatkan konsentrasi sperma diatas 15 juta/ml.

### Data Kelompok Pasien Pria Infertil

Hasil uji deskriptif panjang kepala spermatozoa pasien infertil menunjukkan bahwa panjang rata-rata pada kelompok infertil menggunakan metode Diffquik adalah sekitar 4,32 - 5,51  $\mu\text{m}$ . Sedangkan pada Papanicolaou adalah sekitar 3,49-5,00  $\mu\text{m}$ , dan pada Saffranin adalah sekitar

3,84-5,06  $\mu\text{m}$ . Tampak seperti Tabel 1. dibawah ini.

Tabel 1. Hasil uji deskriptif panjang kepala spermatozoa pasien pria infertile

Metode	n	Mean	Median	Mode	Standart Deviation	Panjang rata-rata (minimum-maximum)
Diffquik	45	5,0638	5,1400	5,25	0,27782	4,32-5,51
Papanicolaou	45	4,4344	4,4800	4,54	0,29797	3,49 – 5,00
Saffranin	45	4,5353	4,5700	4,57	0,25274	3,84-5,06

Hasil uji deskriptif lebar kepala spermatozoa pasien pria infertil menunjukkan bahwa lebar rata-rata pada kelompok infertil menggunakan metode Diffquik adalah sekitar 2,13-4,19  $\mu\text{m}$ . Sedangkan pada Papanicolaou adalah sekitar 1,98-3,48  $\mu\text{m}$ , dan pada Saffranin adalah sekitar 2,10-3,54  $\mu\text{m}$ . Dapat dilihat pada Tabel 2. dibawah ini.

Tabel 2. Hasil uji deskriptif lebar kepala spermatozoa pasien pria infertile

Metode	n	Mean	Median	Mode	Standart Deviation	Lebar rata-rata (minimum-maximum)
Diffquik	45	2,9709	3,0100	3,16	0,4566	2,13-4,19
Papanicolaou	45	2,5704	2,4400	2,43	0,35656	1,98-3,48
Saffranin	45	2,5691	2,5400	2,54	0,32794	2,10-3,54

Hasil uji deskriptif ukuran panjang dan lebar spermatozoa pada pasien pria infertil dibandingkan dengan kriteria Kruger menunjukkan bahwa persentase ukuran panjang dan lebar pada sampel bila dibandingkan dengan kriteria Kruger maka didapati kesamaan 76% pada metode Diffquik, 100% pada metode Papanicolaou, dan 80% pada metode Saffranin. Dapat dilihat pada Tabel 3. dibawah ini.

Tabel 3. Hasil uji deskriptif ukuran panjang dan lebar spermatozoa pada pasien pria infertil dibandingkan dengan kriteria Kruger.

Metode	N	Mean	Median	Mode	Standard Deviation	% panjang dan lebar rata-rata (minimum-maximum)
Diffquik	45	38,27	36,00	30	14,620	0-76
Papanicolaou	45	50,40	48,00	64	20,682	12-100
Safranin	45	49,02	52,00	64	16,151	20-80

Untuk menganalisis hasil uji statistik ukuran kepala sperma spermatozoa maka sebelum dilakukan analisis data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normal pada data yang telah terkumpul menggunakan uji satu sampel Kolmogorov-Smirnov. Semua data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) kecuali pada lebar rata-rata antara papanicolaou, dan safranin. Hasil uji dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji distribusi normal untuk ukuran kepala sperma pasien pria infertil menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*.

Uji distribusi normal	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Safranin
Panjang rata-rata	0,470	0,157	0,646
Lebar rata-rata	0,102	0,023	0,018
% Panjang normal	0,593	0,271	0,307
% Lebar normal	0,428	0,434	0,250
% Normal	0,088	0,619	0,221

Pada hasil uji beda untuk ukuran kepala sperma pasien pria infertil dalam kategori panjang rata-rata, lebar rata-rata, % panjang normal, % lebar normal, dan % normal didapati hasil distribusi normal hanya pada % lebar normal dimana  $p > 0,05$ . Seperti tampak pada tabel dibawah ini.

Tabel 5. Hasil uji beda untuk ukuran kepala sperma pasien pria infertil menggunakan Anova, *Least Significant Difference*, Kruskal-Wallis, Mann Whitney, Brown-Forsythe, dan Games Howell

Uji beda Normal	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Safranin
Panjang rata-rata	< 0,001 (Anova)		
	(LSD)	(LSD)	(LSD)
Lebar rata-rata	< 0,001 (Kruskal-Wallis)		
	(MW)	(MW)	(MW)
% Panjang normal	< 0,001 (Anova)		
	(LSD)	(LSD)	(LSD)
% Lebar normal	0,132 (Anova)		
	-	-	-
% Normal	0,002 (Brown-Forsythe)		
	(GH)	(GH)	(GH)

Pada uji beda panjang rata-rata ketiga metode berdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji analisis varian atau Anova. Pada panjang rata-rata setelah diuji Anova ternyata hasilnya  $p < 0,05$  sehingga dilakukan uji beda dengan menggunakan *Least Significant Difference* (LSD) atau beda nyata terkecil (penentuan beda terkecil tersebut dilihat dari nilai mean pada Tabel 6 dan Tabel 7 dibawah ini).

Tabel 6. Hasil uji beda panjang rata-rata pasien pria infertil menggunakan Anova.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	5,0638 ± 0,27782	< 0,001
Papanicolaou	45	4,4344 ± 0,29797	
Safranin	45	4,5353 ± 0,2574	

Tabel 7. Hasil uji beda panjang rata-rata pasien pria infertil menggunakan *Least Significant Difference (LSD)*.

Metode	n	p	
Diffquik	Papanicolaou	45	< 0,001
	Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou	Diffquik	45	< 0,001
	Saffranin	45	0,086
Saffranin	Diffquik	45	< 0,001
	Papanicolaou	45	0,086

Pada lebar rata-rata pada pasien pria infertil antara pada ketiga metode karena  $p > 0,05$  atau berdistribusi normal maka dilakukan uji analisis Kruskal-Wallis. Pada lebar rata-rata setelah diuji Kruskal-Wallis (KW) ternyata hasilnya  $p < 0,05$  sehingga dilakukan uji beda dengan menggunakan Mann Whitney (MW) dan kemudian didapati hasil seperti Tabel 8. dan Tabel 9. dibawah ini.

Tabel 8. Hasil uji beda lebar rata-rata pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	2,9709 ± 0,45566	< 0,001
Papanicolaou	45	2,5704 ± 0,35656	
Saffranin	45	2,5691 ± 0,32794	

Tabel 9. Hasil uji beda lebar rata-rata pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	< 0,001
Diffquik-Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou-Saffranin	45	0,564

Pada % panjang normal pada pasien pria infertil antara pada ketiga metode karena  $p > 0,05$  atau berdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji analisis varian atau Anova. Pada % panjang normal

setelah diuji Anova ternyata hasilnya  $p < 0,05$  sehingga dilakukan uji beda dengan menggunakan *Least Significant Difference (LSD)* atau beda nyata terkecil dan kemudian didapati hasil seperti Tabel 10. dan Tabel 11. dibawah ini.

Tabel 10. Hasil uji beda % panjang normal pasien pria infertil menggunakan Anova.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	57,47 ± 15,483	< 0,001
Papanicolaou	45	79,78 ± 17,737	
Saffranin	45	77,02 ± 12,458	

Tabel 11. Hasil uji beda % panjang normal pasien pria infertil menggunakan *Least Significant Difference (LSD)*.

Metode	n	p	
Diffquik	Papanicolaou	45	< 0,001
	Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou	Diffquik	45	< 0,001
	Saffranin	45	0,397
Saffranin	Diffquik	45	< 0,001
	Papanicolaou	45	0,397

Pada % lebar normal pada pasien pria infertil antara pada ketiga metode karena  $p > 0,05$  atau berdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji analisis varian atau Anova. Pada % lebar normal setelah diuji Anova ternyata hasilnya  $p > 0,05$  sehingga tidak perlu dilakukan uji beda karena tidak ada perbedaan antara ketiga metode.

Tabel 12. Hasil uji beda % lebar normal pasien pria infertil menggunakan Anova.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	66,93 ± 16,688	0,132
Papanicolaou	45	60,00 ± 19,859	
Saffranin	45	60,36 ± 18,132	

Pada % normal pada pasien pria infertil antara pada ketiga metode karena  $p$

> 0,05 atau berdistribusi normal dan heterogen maka dilakukan uji analisis Brown-Forsythe (BF) dan hasilnya tidak berdistribusi normal  $p < 0,05$ , maka dilakukan uji lanjutan dengan uji statistik Games-Howwell (GH) dan didapati hasil seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 13. Hasil uji beda % normal pasien pria infertil menggunakan Brown Forsythe (BF).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	38,27 ± 14,62	0,002
Papanicolaou	45	50,40 ± 20,682	
Saffranin	45	49,02 ± 16,151	

Tabel 14. Hasil uji beda % normal pasien pria infertil menggunakan Games Howwell (GH).

Metode	n	p	
Diffquik	Papanicolaou	45	0,005
	Saffranin	45	0,004
Papanicolaou	Diffquik	45	0,005
	Saffranin	45	0,934
Saffranin	Diffquik	45	0,004
	Papanicolaou	45	0,934

Pada hasil uji distribusi normal untuk bentuk kepala spermatozoa menggunakan One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test pada pasien pria infertil setelah diuji normal maka didapati perbedaan pada round, amorph, vacuoles > 2, LNV, PA, acrossom < 40%, acrossom > 70%, acrossom terwarnai sempurna, acrossom terwarnai tidak sempurna, kepala terwarnai sempurna maupun tidak sempurna, semua terdapat perbedaan dan tidak berdistribusi normal dengan  $p < 0,05$ .

Tabel 15. Hasil uji distribusi normal untuk bentuk kepala spermatozoa pasien pria infertil menggunakan One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test.

Uji distribusi normal head	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
<i>Tapered</i>	0,193	0,791	0,343
<i>Pryi</i>	0,728	0,684	0,772
<i>Round</i>	0,004	0,003	0,002
<i>Amorph</i>	0,295	0,037	0,074
<i>Vacuoles-&gt;2</i>	0,005	0,144	0,004
<i>Vacuoles-LNV</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Vacuoles-PA</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Acrosom-&lt;40%</i>	< 0,001	0,040	0,023
<i>Acrosom-&gt;70%</i>	< 0,001	0,014	< 0,001
<i>Acrosom-terwarnai sempurna</i>	0,155	< 0,001	< 0,001
<i>Acrosom-terwarnai tidak sempurna</i>	0,121	< 0,001	< 0,001
<i>Num (%)</i>	-	-	-
<i>Other</i>	-	-	-
<i>Head terwarnai sempurna</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Head terwarnai tidak sempurna</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Pada hasil uji beda untuk bentuk kepala sperma pasien pria infertil menggunakan Anova, *Least Significant Difference*, Kruskal-Wallis, Mann Whitney, Brown-Forsythe, dan Games Howell didapatkan hasil distribusi normal  $p > 0,05$  pada bentukan tapered infertil, pyri pasien infertil, round, amorph, acrossom < 40%.

Tabel 16. Hasil uji beda untuk bentuk kepala spermatozoa pasien pria infertil menggunakan Anova, *Least Siginificant Difference*, Kruskal-Wallis, Mann Whitney, Brown-Forsythe, dan Games Howell.

Uji beda head	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
<i>Form-Tapered</i>	-	0,815 (Anova)	-
<i>Form-Pryi</i>	-	0,786 (Anova)	-
<i>Form-Round</i>	-	0,902 (KW)	-
<i>Form-Amorph</i>	-	0,233 (KW)	-
<i>Vacuoles-&gt;2</i>	(MW)	< 0,001 (KW)	(MW)
<i>Vacuoles-LNV</i>	(MW)	0,015 (KW)	(MW)
<i>Vacuoles-PA</i>	(MW)	0,012 (KW)	(MW)
<i>Acrosom-&lt;40%</i>	-	0,676 (KW)	-
<i>Acrosom-&gt;70%</i>	(MW)	0,012 (KW)	(MW)
<i>Acrosom-terwarnai sempurna</i>	(MW)	< 0,001 (KW)	(MW)
<i>Acrosom-terwarnai tidak sempurna</i>	(MW)	< 0,001 (KW)	(MW)
<i>Nim (%)</i>	-	1,000 (KW)	-

Pada *taperred* pasien pria infertil diuji dengan Anova ( $p > 0,05$ ) dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada Tabel 17. dibawah ini.

Tabel 17. Hasil uji beda taperred pasien pria infertil menggunakan Anova.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	18,89 ± 10,050	
Papanicolaou	45	17,82 ± 10,641	0,815
Saffranin	45	17,60 ± 9,960	

Pada *pyri* pasien pria infertil dilakukan uji Anova ( $p > 0,05$ ) dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada Tabel 18. dibawah ini.

Tabel 18. Hasil uji beda pyri pasien pria infertil menggunakan Anova.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	17,87 ± 8,805	
Papanicolaou	45	16,58 ± 9,454	0,786
Saffranin	45	17,20 ± 8,095	

Pada round pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) ( $p > 0,05$ ) dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada Tabel 19. dibawah ini.

Tabel 19. Hasil uji beda round pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	2,84 ± 3,825	
Papanicolaou	45	3,24 ± 4,206	0,902
Saffranin	45	2,58 ± 3,732	

Pada amorph pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) ( $p > 0,05$ ) dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada Tabel 20 dibawah ini.

Tabel 20. Hasil uji beda amorph pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	P
Diffquik	45	6,67 ± 5,800	
Papanicolaou	45	9,02 ± 8,900	0,233
Saffranin	45	9,91 ± 9,591	

Pada vaculoes > 2 pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) ( $p < 0,05$ ) dan didapatkan perbedaan, lalu dilakukan uji beda Mann-Whitney (MW). Uji beda tidak ada beda pada diff-saff, disajikan pada Tabel 21. dan Tabel 22.



Tabel 21. Hasil uji beda vacuoles > 2 pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	P
Diffquik	45	2,76 ± 4,206	< 0,001
Papanicolaou	45	12,44 ± 9,908	
Saffranin	45	5,51 ± 7,933	

Tabel 22. Hasil uji beda vacuoles > 2 pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	< 0,001
Diffquik-Saffranin	45	0,065
Papanicolaou-Saffranin	45	< 0,001

Pada Vacuoles LNV pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan didapatkan perbedaan ( $p < 0,05$ ), lalu dilakukan uji beda Mann-Whitney (MW). Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 23. Hasil uji beda vacuoles LNV pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,18 ± 0,576	0,015
Papanicolaou	45	1,42 ± 2,472	
Saffranin	45	0,98 ± 1,936	

Tabel 24. Hasil uji beda vacuoles LNV pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	0,004
Diffquik-Saffranin	45	0,020
Papanicolaou-Saffranin	45	0,505

Pada Vacuoles PA pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan didapatkan perbedaan ( $p < 0,05$ ), lalu dilakukan uji beda Mann-Whitney (MW). Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 25. Hasil uji beda vacuoles PA pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,22 ± 0,974	0,012
Papanicolaou	45	1,51 ± 3,050	
Saffranin	45	0,40 ± 1,009	

Tabel 26. Hasil uji beda vacuoles PA pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	0,005
Diffquik-Saffranin	45	0,019
Papanicolaou-Saffranin	45	0,127

Pada akrosom < 40% pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan tidak didapatkan perbedaan ( $p > 0,05$ ), hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 27. Hasil uji beda akrosom < 40% pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	7,87 ± 13,235	0,676
Papanicolaou	45	8,00 ± 9,863	
Saffranin	45	8,18 ± 9,666	

Pada akrosom > 70% pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan didapatkan perbedaan ( $p < 0,05$ ), lalu dilakukan uji beda Mann-Whitney (MW). Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 28. Hasil uji beda akrosom > 70 % pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,80 ± 1,878	0,002
Papanicolaou	45	3,78 ± 5,226	
Saffranin	45	2,53 ± 4,143	

Tabel 29. Hasil uji beda akrosom > 70 % pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	0,001
Diffquik-Saffranin	45	0,017
Papanicolaou-Saffranin	45	0,191

Pada akrosom terwarnai sempurna pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan didapatkan perbedaan ( $p < 0,05$ ), lalu dilakukan uji beda Mann Whitney (MW). Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 30. Hasil uji beda akrosom terwarnai sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	22,00 ± 18,434	
Papanicolaou	45	2,13 ± 6,126	< 0,00
Saffranin	45	4,04 ± 8,888	

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	77,16 ± 19,105	
Papanicolaou	45	96,89 ± 7,514	< 0,001
Saffranin	45	95,29 ± 9,818	

Tabel 31. Hasil uji beda akrosom terwarnai sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	< 0,001
Diffquik-Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou-Saffranin	45	0,799

Pada akrosom tidak terwarnai sempurna pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan didapatkan perbedaan ( $p < 0,05$ ), lalu dilakukan uji beda Mann-Whitney (MW). Uji beda disajikan pada Tabel 32 dan Tabel 33 dibawah ini.

Tabel 32. Hasil uji beda akrosom terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	22,00 ± 18,434	
Papanicolaou	45	2,13 ± 6,126	< 0,001
Saffranin	45	4,04 ± 8,888	

Tabel 33. Hasil uji beda akrosom terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	< 0,001
Diffquik-Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou-Saffranin	45	0,487

Pada num (jumlah lebih dari 1) (%) pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan tidak didapatkan perbedaan ( $p > 0,05$ ), hasilnya seperti pada Tabel 34. dibawah ini.

Tabel 34. Hasil uji beda num % pasien infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,001 ± 0,0001	
Papanicolaou	45	0,001 ± 0,0001	1,000
Saffranin	45	0,001 ± 0,0001	

Pada other pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan tidak didapatkan perbedaan ( $p > 0,05$ ), hasilnya seperti pada Tabel 35 dibawah ini.

Tabel 35. Hasil uji beda other pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,001 ± 0,0001	
Papanicolaou	45	0,001 ± 0,0001	1,000
Saffranin	45	0,001 ± 0,0001	

Pada head terwarnai sempurna pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal Wallis (KW) dan didapatkan perbedaan ( $p < 0,05$ ), lalu dilakukan uji beda Mann-

Whitney (MW). Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini

Tabel 36. Hasil uji beda head terwarnai sempurna pasien pria infertile menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	83,96 ± 32,332	0,010
Papanicolaou	45	88,36 ± 31,652	
Saffranin	45	84,98 ± 34,138	

Tabel 37. Hasil uji beda head terwarnai sempurna pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	0,003
Diffquik-Saffranin	45	0,057
Papanicolaou-Saffranin	45	0,292

Pada head terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis (KW) dan didapatkan perbedaan ( $p < 0,05$ ), lalu dilakukan uji beda Mann-Whitney (MW). Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 38. Hasil uji beda head terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	2,13 ± 5,367	0,011
Papanicolaou	45	0,53 ± 1,878	
Saffranin	45	0,53 ± 2,191	

Tabel 39. Hasil uji beda head terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	0,013
Diffquik-Saffranin	45	0,200
Papanicolaou-Saffranin	45	0,786

Pada hasil uji distribusi normal untuk *mid piece* spermatozoa pasien pria infertil menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* setelah diuji

normal maka didapati hasil semua bentuk *mid piece* tidak berdistribusi normal dengan  $p < 0,05$  kecuali bentuk *thick* pada pewarnaan *diffquik* dan *saffranin* berdistribusi normal dengan  $p > 0,05$ .

Tabel 40. Hasil uji distribusi normal untuk bentuk *mid piece* spermatozoa pasien pria infertil menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*.

Uji distribusi normal <i>mid piece</i>	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
<i>Insertion</i>	< 0,001	< 0,001	0,007
<i>Thick</i>	0,168	0,014	0,369
<i>Thin</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Irregular</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Bent</i>	0,002	0,004	0,008
Terwarnai Sempurna	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Terwarnai tidak sempurna	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Pada hasil uji beda untuk bentuk I sperma pasien pria infertil menggunakan *Anova*, *Least Significant Difference*, *Kruskal-Wallis*, *Mann Whitney*, *Brown-Forsythe*, dan *Games Howell* didapatkan data pada umumnya berdistribusi normal  $p > 0,05$ . Data dapat dilihat pada Tabel 41. dibawah ini.

Tabel 41. Hasil uji beda untuk bentuk mid piece spermatozoa pasien pria infertil menggunakan Anova, *Least Significant Difference*, Kruskal-Wallis, Mann Whitney, Brown-Forsythe, dan Games Howell.

Uji beda mid piece	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
Insertion		0,096 (KW)	
Thick		0,399 (KW)	
Thin		0,502 (KW)	
Irregular		0,818 (KW)	
Bent		0,716 (KW)	
Terwarnai Sempurna		0,998 (KW)	
Terwarnai Tidak Sempurna		0,757 (KW)	

Pada *insertion* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 42. Hasil uji beda insertion pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	1,91 ± 3,789	
Papanicolaou	45	2,22 ± 4,456	0,096
Saffranin	45	3,16 ± 4,700	

Pada *thick* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 43. Hasil uji beda thick pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	13,51 ± 12,542	
Papanicolaou	45	11,42 ± 11,604	0,399
Saffranin	45	12,98 ± 7,800	

Pada *thin* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 44. Hasil uji beda thin pria pasien infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,44 ± 2,408	
Papanicolaou	45	0,53 ± 1,618	0,502
Saffranin	45	0,62 ± 1,696	

Pada *irregular* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini dengan  $p > 0,05$ .

Tabel 45. Hasil uji beda irregular pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	1,56 ± 3,997	
Papanicolaou	45	1,87 ± 3,703	0,818
Saffranin	45	1,73 ± 3,991	

Pada *bent* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 46. Hasil uji beda bent pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	3,64 ± 5,820	
Papanicolaou	45	4,67 ± 7,274	0,716
Saffranin	45	4,36 ± 5,331	

Pada *mid peice* terwarnai sempurna pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 47. Hasil uji beda mid pice terwarnai sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	98,40 ± 4,505	
Papanicolaou	45	98,13 ± 4,737	0,998
Saffranin	45	97,78 ± 6,371	

Pada *mid piece* terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil dilakukan uji

Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 48. Hasil uji beda mid piece terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	N	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	1,29 ± 4,267	
Papanicolaou	45	1,07 ± 3,683	0,757
Saffranin	45	1,96 ± 5,916	

Pada hasil uji distribusi normal untuk bentuk principal piece spermatozoa menggunakan One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test hanya pada bentukan coiled yang memiliki data yang berdistribusi normal  $p > 0,05$ .

Tabel 49. Hasil uji distribusi normal untuk bentuk principal piece spermatozoa pasien pria infertil menggunakan One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test.

Uji distribusi	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
normal <i>principal piece</i>			
<i>Short</i>	< 0,001	< 0,001	-
<i>Multiple</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Broken</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Bent</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Irregular</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>Looped</i>	0,009	0,016	0,038
<i>Coiled</i>	0,078	0,184	0,159
Terwarnai Sempurna	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Terwarnai tidak sempurna	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Pada hasil uji beda untuk bentuk principal piece sperma pasien pria infertil menggunakan Anova, *Least Significant Difference*, Kruskal-Wallis, Mann Whitney, Brown-Forsythe, dan Games Howell semua berdistribusi normal dengan  $p > 0,05$ .

Tabel 50. Hasil uji beda untuk bentuk principal piece spermatozoa pasien pria infertil menggunakan Anova, *Least Significant Difference*, Kruskal-Wallis, Mann Whitney, Brown-Forsythe, dan Games Howell.

Uji beda <i>principal piece</i>	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
<i>Short</i>		0,604 (KW)	
<i>Multiple</i>		0,900 (KW)	
<i>Broken</i>		0,131 (KW)	
<i>Bent</i>		0,792 (KW)	
<i>Irregular</i>		0,762 (KW)	
<i>Looped</i>		0,680 (KW)	
<i>Coiled</i>		0,284 (Anova)	
Terwarnai Sempurna		0,960 (KW)	
Terwarnai Tidak Sempurna		0,579 (KW)	

Pada short pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 51. Hasil uji beda short pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,31 ± 2,087	
Papanicolaou	45	0,04 ± 0,298	0,604
Saffranin	45	0,001 ± 0,0001	

Pada multiple pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 52. Hasil uji beda multiple pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,13 ± 0,505	
Papanicolaou	45	0,18 ± 0,576	0,900
Saffranin	45	0,22 ± 0,765	

Pada broken pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 53. Hasil uji beda broken pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,76 ± 1,921	
Papanicolaou	45	0,49 ± 1,424	0,131
Saffranin	45	0,13 ± 0,661	

Pada *bent* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 54. Hasil uji beda bent pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	1,33 ± 2,594	
Papanicolaou	45	1,07 ± 2,199	0,792
Saffranin	45	1,11 ± 1,186	

Pada *irregular* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 55. Hasil uji beda irregular pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,58 ± 1,252	
Papanicolaou	45	0,84 ± 2,153	0,762
Saffranin	45	0,53 ± 1,440	

Pada *looped* pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 56. Hasil uji beda looped pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	4,40 ± 4,721	
Papanicolaou	45	3,87 ± 4,099	0,680
Saffranin	45	3,64 ± 4,518	

Pada *coiled* pasien pria infertil dilakukan uji *Anova* dan tidak didapatkan

perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 57. Hasil uji beda coiled pasien pria infertil menggunakan Anova.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	6,49 ± 6,181	
Papanicolaou	45	6,67 ± 6,782	0,284
Saffranin	45	4,84 ± 4,945	

Pada *principal piece* terwarnai sempurna pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 58. Hasil uji beda *principal piece* terwarnai sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	94,98 ± 19,696	
Papanicolaou	45	98,80 ± 3,917	0,960
Saffranin	45	99,07 ± 2,973	

Pada *principal piece* terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan tidak didapatkan perbedaan, hasilnya seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 59. Hasil uji beda *principal piece* terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,67 ± 2,828	
Papanicolaou	45	0,67 ± 3,104	0,579
Saffranin	45	0,80 ± 2,464	

Pada hasil uji distribusi normal untuk bentuk *ERC* sperma pasien pria infertile menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* didapati hasil uji distribusi normal  $p > 0,05$  hanya pada uji *ERC* normal pada pewarnaan diffquik

dan *ERC* tidak normal pada pewarnaan papanicolaou dan saffranin.

Tabel 60. Hasil uji distribusi normal untuk bentuk *ERC* spermatozoa pasien pria infertil menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*.

Uji distribusi normal <i>ERC</i>	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
Terwarnai sempurna	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Terwarnai tidak sempurna	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Normal	< 0,001	0,134	0,007
Tidak Normal	< 0,001	0,179	0,324

Pada hasil uji beda untuk bentuk *ERC* sperma pasien pria infertil menggunakan *Anova*, *Least Significant Difference*, *Kruskal-Wallis*, *Mann Whitney*, *Brown-Forsythe*, dan *Games Howell* didapatkan data berdistribusi tidak normal  $p < 0,05$  pada *ERC* yang terwarnai sempurna dan *ERC* bentukan normal maupun tidak normal, dan data berdistribusi normal dengan  $p > 0,05$  pada *ERC* terwarnai tidak sempurna. Hasilnya dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 61. Hasil uji beda untuk bentuk *ERC* spermatozoa pasien pria infertil menggunakan *Anova*, *Least Significant Difference*, *Kruskal-Wallis*, *Mann Whitney*, *Brown-Forsythe*, dan *Games Howell*.

Uji beda <i>ERC</i>	Infertil		
	Diffquik	Papanicolaou	Saffranin
Terwarnai Sempurna		< 0,001 (KW)	
	(MW)	(MW)	(MW)
Terwarnai Tidak Sempurna		1,000 (KW)	
	-	-	-
Normal		< 0,001 (KW)	
	(MW)	(MW)	(MW)
Tidak Normal		< 0,001 (KW)	
	(MW)	(MW)	(MW)

Pada *ERC* terwarnai sempurna pasien pria infertil dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan didapatkan perbedaan, lalu dilakukan uji beda *Mann-Whitney*. Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 62. Hasil uji beda *ERC* terwarnai sempurna pasien pria infertil menggunakan *Kruskal Wallis (KW)*.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	9,24 ± 28,694	< 0,001
Papanicolaou	45	86,93 ± 32,262	
Saffranin	45	81,69 ± 37,518	

Tabel 63. Hasil uji beda *ERC* terwarnai sempurna pasien pria infertil menggunakan *Mann Whitney (MW)*.

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	< 0,001
Diffquik-Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou-Saffranin	45	0,420

Pada *ERC* terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan tidak didapatkan perbedaan. Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 64. Hasil uji beda *ERC* terwarnai tidak sempurna pasien pria infertil menggunakan *Kruskal Wallis (KW)*.

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	0,04 ± 0,298	1,000
Papanicolaou	45	0,09 ± 0,596	
Saffranin	45	0,04 ± 0,298	

Pada *ERC* normal pasien pria infertil dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan didapatkan perbedaan, lalu dilakukan uji beda *Mann-Whitney*. Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 65. Hasil uji beda ERC normal pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	17,42 ± 37,564	< 0,001
Papanicolaou	45	89,87 ± 7,959	
Saffranin	45	86,31 ± 14,635	

Tabel 66. Hasil uji beda ERC normal pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	< 0,001
Diffquik-Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou-Saffranin	45	0,093

Pada ERC tidak normal pasien pria infertil dilakukan uji Kruskal-Wallis dan didapatkan perbedaan, lalu dilakukan uji beda Mann-Whitney. Uji beda disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 67. Hasil uji beda ERC tidak normal pasien pria infertil menggunakan Kruskal Wallis (KW).

Metode	n	Rata-rata ± Simpangan baku	p
Diffquik	45	2,44 ± 3,101	< 0,001
Papanicolaou	45	9,51 ± 7,724	
Saffranin	45	11,24 ± 6,271	

Tabel 68. Hasil uji beda ERC tidak normal pasien pria infertil menggunakan Mann Whitney (MW).

Metode	n	p
Diffquik-Papanicolaou	45	< 0,001
Diffquik-Saffranin	45	< 0,001
Papanicolaou-Saffranin	45	0,090

Analisis sperma terutama pada evaluasi morfologi dengan menggunakan ketiga metode pewarnaan yang berbeda ternyata menghasilkan ukuran panjang dan lebar yang berbeda ( $p < 0,05$ ) namun perbedaan tersebut tidak terlalu mencolok.

Seperti kita ketahui menurut kriteria Kruger panjang kepala spermatozoa normal adalah 4-5  $\mu\text{m}$  dan lebar 2,5-3,5  $\mu\text{m}$ .

Pada data analisis statistik ditemukan pada kelompok pasien pria infertil metode diffquik ditemukan panjang 4,32-5,51  $\mu\text{m}$  dan lebar 2,13-4,19  $\mu\text{m}$ , metode papanicolaou ditemukan panjang 3,49-5,00  $\mu\text{m}$  dan lebar 1,98-3,48  $\mu\text{m}$ , dan pada metode saffranin-cv ditemukan panjang 3,84-5,06  $\mu\text{m}$  dan lebar ditemukan 2,10-3,54  $\mu\text{m}$  seperti pada Tabel 1 dan Tabel 2 dimana metode saffranin-cv lebih mendekati ukuran kepala spermatozoa metode papanicolaou. Pada uji beda ukuran kepala spermatozoa kelompok pasien pria infertil antara ketiga metode dibandingkan dengan kriteria Kruger didapati hasil bahwa metode saffranin-kristal violet lebih mendekati hasil metode papanicolaou. Pada Tabel 3 perbandingan antara ketiga metode bila dibandingkan dengan kriteria Kruger maka didapati perbedaan antara ketiga metode pada panjang rata-rata, lebar rata-rata, % panjang normal, dan juga % normal dimana hasilnya adalah pada panjang rata-rata metode saffranin-cv tidak ada beda dengan metode papanicolaou. Begitu pula pada lebar rata-rata, % panjang normal, % normal, sedangkan pada % lebar normal



pada ketiga metode tidak didapatkan perbedaan (normalitas ini adalah hasil setelah dibandingkan dengan kriteria Kruger).

Pada uji beda bentuk kepala spermatozoa kelompok pasien pria infertil, bentukan *taperred*, *pyri*, *round*, *amorph*, akrosom < 40% tidak didapatkan perbedaan pada ketiga metode seperti pada Tabel 16. 81. Pada bentukan vakuola terdapat perbedaan pada ketiga metode dimana metode papanicolaou lebih bagus dalam menganalisis bentukan vakuola seperti tampak pada Tabel 21., Tabel 23., Tabel 26. Kemudian pada metode safranin-cv juga memiliki nilai statistik yang mendekati metode papanicolaou. Pada bentukan akrosom, metode diffquik tampak kurang dapat menganalisis dengan baik berbeda dengan metode safranin-cv dan metode papanicolaou seperti pada Tabel 28. Metode papanicolaou dan metode safranin-cv dapat mewarnai kepala spermatozoa dengan sempurna seperti pada Tabel 31.

Pada uji beda bentuk *midpeice* dan bentuk *principal piece* pada kelompok pasien pria infertil antara ketiga metode tidak didapati perbedaan seperti pada Tabel 41.

Pada uji beda bentuk *ERC* kelompok pasien pria infertil didapati hasil bahwa

metode *papanicolaou* lebih bagus didalam mewarnai *ERC* dengan rata-rata dan simpangan baku seperti pada Tabel 62. dan metode safranin-cv dengan rata-rata dan simpangan baku yang mendekati papanicolaou seperti pada tabel 65.

Dari data hasil penelitian didapatkan bahwa pada kelompok pasien pria infertil pada metode papanicolaou tampak ukuran panjang dan lebar yang relatif lebih kecil daripada yang lainnya. Hal ini mungkin dikarenakan pada prosedur pewarnaan papanicolaou harus melalui fiksasi bertingkat (alkohol 95%, 80%, 70% dan 50%). Sehingga sel spermatozoa mengalami sedikit pengerutan walaupun terdapat proses rehidrasi sel. Metode papanicolaou juga memiliki keunggulan dalam menganalisis bentukan vakuola, akrosom maupun *ERC*. Hal tersebut dikarenakan pewarnaan pada nukleus sebagian besar dilakukan oleh zat pewarna: haematoxylin. Pada haematoxylin didapati garam aluminium, besi, dan krom serta bahan oksidasi dimana akan menambah intensitas warna dan membuat differensiasi warna menjadi bagus (bahan tersebut biasa disebut sebagai *mordant*). (*basic staining theory* 2006).

Pada diffquik terdapat methylan blue (thiazin) yang sifatnya basophilic (ion

positif) yang dimana akan mengikat ion protein negatif (pada thiazin tidak diperlukan mordant) dikatakan karena pada pewarnaan diffquik, thiazin memiliki sifat polichromatis dan telah dicampur dengan buffer phospat pada larutan DiffQuik II. Mungkin hal ini yang menyebabkan diffquik tampak tebal pada daerah kepala. Sehingga Pada metode pewarnaan diffquik pasien infertil tampak bahwa ukuran panjang spermatozoa lebih panjang daripada kedua metode yang lainnya, juga dikarenakan diffquik memiliki teknik fiksasi yang sederhana dimana hanya dilakukan satu *step* mungkin hal tersebut yang menyebabkan sehingga differensiasi warna tampak tidak sempurna. Ternyata hal ini juga sesuai dengan penelitian sebelumnya (*James and Collegues* 1996).

Pada metode saffranin-cv ukuran panjang spermatozoa pada kelompok pria pasien infertil tidak setebal ukuran diffquik. Hal ini mungkin dikarenakan pada saffranin-kristal violet terdapat stabilisasi pH atau keasaman oleh buffer phospat yang dilakukan sebanyak dua *step* 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. Selain itu

terdapat zat warna saffranin yang dimana memiliki kelebihan sebagai indikator warna pada pH yang seimbang juga ada bahan metil alkohol sebagai decolourizer dan fiksatif yang dilakukan pada langkah awal sebelum pengecatan, disamping larutan buffer phospat yang bisa menyeimbangkan pH sehingga differensiasi warna menjadi makin bagus. (*basic staining theory* 2006)

#### D. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode safranin-kristal violet layak digunakan sebagai metode pewarnaan alternatif lain. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membandingkan kelompok pasien pria infertil dengan metode papanicolaou, metode saffranin-kristal violet dan metode diffquik.

#### DAFTAR PUSTAKA

- S Pieters, Onny.1978, Kuliah Analisa Sperma Universitas Airlangga.pp13
- Anonim, 1996. Journal of Clinical Microbiology.volume 34 No10; [1 screen]. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articles/11542111/pdf/Assessment\\_of\\_Spermatozoa\\_Morphology\\_under\\_Light\\_Microscopy\\_with\\_Different\\_Histologic\\_Stains\\_and\\_Comparison\\_of\\_Morphometric\\_Measurements.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articles/11542111/pdf/Assessment_of_Spermatozoa_Morphology_under_Light_Microscopy_with_Different_Histologic_Stains_and_Comparison_of_Morphometric_Measurements.pdf)
- Barroso G, Mercan R, Ozgur K, Morshedi M, Kolm P, Coetzee K, et al. Intra- and inter- laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen preparation, staining techniques and

- manual versus computerized analysis. *Hum Reprod* 1999; 14:2036-40.
- Moeloek, N.1983, *Standarisasi Analisis Semen Manusia*; Per.Biok. Ind.Jakarta. 1983.
- Coetzee K, Kruger TF, Lobard CJ, Shaughnessy D, Oehringer S, Özgür K, et al. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil Steril* 1999; 71:80-4.
- Henkel R, Schreiber G, Sturmhoefel A, Hipler UC, Zermann DH, Menkveld R. Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2008; 89:449-55.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehringer S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49:112-7.
- Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJVW, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990; 5:586-92. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 4th edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 5th edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
- Anonim, 2006. *Staining Theory*. pdf., pp 68-91. Available at:<http://www.scribt.com>mobile>doc>.