

Efisiensi Modifikasi Metode Fiksasi dan Dehidrasi terhadap Pengamatan Scanning Electron Microscope (SEM) Spermatozoatozoa Tikus Wistar

Efficiency of Fixation and Dehydration Modification Methods on Scanning Electron Microscope (SEM) Observation of Rat Spermatozoatozoa

Anggi Suci Febriani¹, Erintha Eka Wardani²

¹Laboratorium Mikroskop, Institut Biosains, Universitas Brawijaya Malang 65145, Indonesia

²Laboratorium Biologi Molekuler, Institut Biosains, Universitas Brawijaya Malang 65145, Indonesia

Abstrak

Scanning Electron Microscope (SEM) merupakan mikroskop elektron dengan prinsip interaksi antara elektron dan atom dalam sampel sehingga menghasilkan gambar permukaan sampel dengan resolusi tinggi (hingga 30.000 x) . Pemanfaatan SEM dapat digunakan untuk pengamatan pada spermatozoatozoa cairan semen tikus wistar jantan. Efisiensi waktu dan keterbatasan bahan kimia di laboratorium sering menjadi penghambat dalam preparasi sampel spermatozoa sehingga perlu dilakukan modifikasi metode. Modifikasi preparasi sampel spermatozoa dilakukan dengan metode fiksasi dengan larutan glutaraldehid 3% selama 1 jam untuk efisiensi waktu. Post fiksasi dengan larutan *osmium tetroxide (osmic acid)* tidak dilakukan karena harga larutan yang mahal. Tahapan dilanjutkan dengan pencucian dengan buffer fosfat pH 7,4 dan dehidrasi pertama menggunakan alkohol bertingkat (30%,50%,70%,80%,90%,96%). Dehidrasi kedua menggunakan larutan *amyl* asetat tidak dilakukan karena larutan sulit didapatkan. Hasil pada gambar dengan modifikasi metode menunjukkan kualitas gambar ekor dan kepala pada spermatozoa terlihat jelas hingga perbesaran 18.000 x. Kesimpulan dari modifikasi metode ini adalah efisiensi waktu dan bahan sehingga preparasi sampel spermatozoa untuk pengamatan SEM lebih mudah dan terjangkau.

Kata Kunci : dehidrasi, fiksasi, glutaraldehid, SEM, spermatozoatozoa

Abstract

Scanning Electron Microscope (SEM) is an electron microscope with the principle of interaction between electrons and atoms in the sample to produce high-resolution images of the sample surface (up to 30,000 times). Utilization of SEM can be used for observation of rat semen spermatozoatozoa. Time efficiency and limitations of chemicals in the laboratory often become obstacles in the preparation of sperm samples, so it is necessary to modify the method. Modification of sperm sample preparation was carried out by fixation method with 3% glutaraldehyde solution for 1 hour for time efficiency. Post fixation with osmium tetroxide (osmic acid) solution was not carried out due to the high cost of the solution. This step was followed by washing with phosphate buffer pH 7.4 and first dehydration using graded alcohol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%). The second dehydration using amyl acetate solutions was not carried out because the solutions were difficult to obtain. The results on the images with the modified method show that the quality of the tail and head images of the sperm is clearly visible up to 18,000x magnification. The conclusion of the modification of this method is the efficiency of time and materials so that sperm sample preparation for SEM observation is easier and more affordable.

Keywords : dehydration,fixation,glutaraldehyde,SEM,spermatozoatozoa

1. Pendahuluan

Scanning Electron Microscope (SEM) merupakan instrumen yang digunakan untuk mengamati permukaan material dengan prinsip interaksi antara elektron dan atom dalam sampel sehingga menghasilkan gambar permukaan sampel dengan resolusi tinggi (hingga 30.000 kali). Tembakan elektron yang besar pada sampel dapat menghasilkan gambar berupa topografi, morfologi, komposisi,orientasi butiran, informasi kristalografi, dari suatu bahan (Akhtar et.al., 2018). Pemanfaatan SEM dapat digunakan untuk pengamatan *spermatozoa* pada cairan semen tikus wistar. Tikus putih wistar merupakan salah satu hewan coba yang digunakan dalam mempelajari reproduksi.

Spermatozoa pada tikus mempunyai ukuran yang lebih panjang daripada ukuran pada mamalia lainnya. *Spermatozoa* tikus mempunyai ukuran 150-200 μm dengan bentuk kepala seperti kail (Krinke, 2000; Wuwungan, et.al., 2017). *Spermatozoa* diambil dari testis tikus jantan. Testis berada pada dua kantung skrotum yang dipisahkan oleh membran tipis yang terletak di antara anus dan preputium (Suckow, 2006; Wuwungan, et.al., 2017). Untuk mendeskripsikan morfologi *spermatozoa* secara akurat membutuhkan alat dengan visualisasi yang baik. *Spermatozoa* pertama kali divisualisasikan dengan SEM sekitar tahun 1940-an (Donovan., 1944; Korneev., et.al., 2021). Pengamatan *spermatozoa* dengan menggunakan SEM dapat memberikan banyak informasi seperti identifikasi, klasifikasi struktural, dan karakteristik morfologi (Sathananthan, 2013; Nussdorfer, et al., 2018). Permukaan sel *spermatozoa* dapat dilihat pada resolusi nanometer dalam berbagai perbesaran dengan SEM (Goodhew PJ, et.al., 2000; Nussdorfer, et al., 2018).

Imaging yang dihasilkan dengan SEM lebih baik dan efektif jika sel-selnya tersebar dalam bentuk *monolayer*. Hal ini berlaku pada sel dengan bentuk memanjang salah satunya *spermatozoa* yang seringkali menumpuk pada saat preparasi. Prosedur paling mudah untuk preparasi sel *spermatozoa* dalam cairan bentuk *monolayer* adalah dengan meneteskan cairan pada permukaan adesif tinggi, mengendapkan sel, dan membuang sisa cairan. Protokol awal preparasi *spermatozoa* yang dikembangkan pada awal tahun 1970-an terdiri dari penggunaan berurutan larutan fiksatif (glutaraldehid, formaldehid, dan *osmium tetroxide*), pencucian dengan *saline solutions*, pembentukan *monolayer*, dehidrasi (dengan udara, critical point karbondioksida, dan kimia), dan tahap akhir coating menggunakan logam atau karbon (Mazia, et.al., 1975; Korneev., et.al., 2020).

Spermatozoa merupakan material biologis yang lunak sehingga harus dilindungi dari tahapan vakum dengan aliran elektron yang besar di dalam SEM sehingga harus melalui beberapa tahapan preparasi. Tahap awal preparasi adalah fiksasi dengan menggunakan larutan fiksatif yang bertujuan menstabilkan jaringan sehingga hasil pengamatan tidak berbeda dengan aslinya (Mascorro & Bozzola, 2017). *Buffer* glutaraldehid merupakan larutan fiksatif yang paling umum digunakan untuk mikroskop elektron (Hayat, 1986; Korneev, et.al., 2021). *Osmium tetroxide* atau *tannic acid* biasanya digunakan untuk larutan post fiksasi. Larutan post fiksasi bertujuan untuk menstabilkan lipid dalam membran sel (Hayat, 1981; Korneev, et.al., 2021). Tahapan setelah fiksasi adalah dehidrasi. Dehidrasi bertujuan untuk menghilangkan air pada sel. Tahap dehidrasi menggunakan etanol bertingkat dari konsentrasi rendah ke tinggi sehingga molekul air pada sampel dapat hilang sepenuhnya (Meek, 1976; Bhattacharya et al. 2020).

Proses preparasi *spermatozoa* membutuhkan waktu berjam-jam dari persiapan bahan dan larutan hingga proses pengamatan selesai. Lamanya waktu yang dibutuhkan dalam proses preparasi, keterbatasan bahan kimia di laboratorium, dan harga bahan kimia yang mahal sering menjadi penghambat dalam preparasi sampel *spermatozoa*. Tujuan dari penelitian ini adalah modifikasi metode preparasi sampel *spermatozoa* untuk pengamatan SEM yang lebih mudah, cepat, dan terjangkau.

2. Bahan dan Metode

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 17-21 Juli 2023. Pengambilan sampel *spermatozoa* dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang. Preparasi sampel dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan pengamatan dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dilaksanakan Laboratorium Mikroskop Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang.

2.2 Pengambilan Spermatozoa Tikus

Tikus jantan wistar (*Rattus norvegicus*) dibius dengan menggunakan eter. Tikus kemudian dibedah pada bagian kauda epididimis (Wuwungan, 2017). Saluran *spermatozoa* dipijat secara memanjang agar cairan semen dapat menetes. Cairan semen ditempatkan pada *microcentrifuge tube*. Sampel kemudian disimpan dalam freezer -20°C hingga siap dilakukan preparasi.

2.3 Preparasi Sampel Spermatozoa untuk Pengamatan dengan SEM

Cairan semen tikus wistar sebanyak 100 μL ditambah dengan larutan PBS 1 mL kemudian dihomogenasi dengan *vortex*. Sampel ditambah dengan larutan glutaraldehid 3% 1 mL kemudian

diinkubasi selama 1 jam pada suhu 4°C. Sampel yang bercampur larutan glutaraldehid kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 x g, selama 5 menit, pada suhu 4°C. Pelet dicuci dengan larutan *buffer* fosfat pH 8.0 sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Larutan *buffer* fosfat pH 8.0 dibuang pada masing-masing pencucian kecuali pada pencucian terakhir. Pelet kemudian dilarutkan dengan *buffer* fosfat pH 8.0 dan disimpan pada *refrigerator* 4°C.

Tahapan dilanjutkan dengan dehidrasi menggunakan etanol bertingkat. Sebanyak 5 *cover glass* disiapkan, sampel sebanyak 100 µL ditetaskan pada *cover glass* kemudian diratakan dengan mikrotips diusahakan agar tidak terlalu menggenang. Dehidrasi dilakukan dengan pengeringan menggunakan bunsen dengan cara menggoyangkan *cover glass* secara perlahan di atas api bunsen. *Cover glass* dijepit dengan menggunakan pipet. Pembakaran diusahakan tidak menyentuh api secara langsung agar sampel tidak hangus terbakar. Sampel yang telah kering ditetesi dengan etanol bertingkat (30%,50%,70%,80%,90%,96%) secara bergantian kemudian didiamkan selama 5 menit. Setiap penambahan etanol dilakukan pengeringan dengan api bunsen. Selanjutnya dilakukan *coating* pada sampel dengan *gold* dengan menggunakan alat *coating* Quorum Q150R S. Proses *coating* membutuhkan waktu selama 90 detik. Sampel diamati dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) Hitachi TM3000.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Efisiensi Waktu Preparasi dan Penggunaan Larutan

Tabel 1. Tahapan dan penggunaan waktu pada metode sebelum modifikasi (Wael, et.al., 2018).

Tahapan	Waktu yang dibutuhkan
Fiksasi glutaraldehid 2,5%, paraformaldehid 2% <i>buffer</i> sodium fosfat pH 7.4	<i>overnight</i> (24 jam)
Pencucian <i>buffer</i> sodium fosfat pH 7.4	3x15 menit = 45 menit
Post fiksasi <i>osmium tetroxide</i>	90 menit
Pencucian post fiksasi <i>buffer</i> sodium fosfat pH 7.4	3x15 menit = 45 menit
	Total waktu = 27 jam

Metode preparasi untuk pengamatan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dalam penelitian ini mengacu pada metode Wael, et.al., 2018. Sampel disentrifugasi 500 x g 20 menit, pelet diambil kemudian dilakukan fiksasi dengan larutan glutaraldehid 2,5%, paraformaldehid 2%, dan *buffer* sodium fosfat pH 7.4 selama satu malam. Sampel kemudian dicuci sebanyak 3 kali masing-masing 15 menit dengan *buffer* sodium fosfat pH 7.4. Post fiksasi dilakukan dengan penambahan *osmium tetroxide* pH 7.4 dan diinkubasi selama 90 menit. Pelet kemudian dicuci *buffer* sodium fosfat pH 7.4. *Cover glass* ditetesi dengan 100% aseton sebelum sampel ditetaskan. Sampel pada *cover glass* didehidrasi dengan menggunakan etanol bertingkat. *Coating* pada sampel dilakukan dengan menggunakan *gold-palladium* dan sampel diamati dengan SEM (Jeol-JSM-6510 LV). SEM dioperasikan pada 30 kV. Total waktu keseluruhan yang dibutuhkan untuk preparasi sampel spermatozoa sebelum dilakukan modifikasi adalah 27 jam (tabel 1). Total waktu tersebut belum termasuk waktu yang dibutuhkan untuk dehidrasi, *coating*, dan pengamatan SEM.

Tabel 2. Tahapan dan penggunaan waktu pada metode setelah modifikasi

Tahapan dan modifikasinya	Modifikasi waktu
Fiksasi glutaraldehyd 3%	1 jam
Sentrifugasi	5 menit
Pencucian <i>buffer</i> fosfat pH 8.0	3x5 menit= 15 menit
Dehidrasi etanol bertingkat	6x5 menit= 30 menit
<i>Coating gold</i>	90 detik
	Total waktu= 1 jam 51,5 menit

Modifikasi yang dilakukan adalah penambahan larutan *Phospate Buffer Saline* (PBS). Penambahan PBS merupakan larutan yang tidak beracun dan banyak ditemukan di laboratorium biologis. PBS berfungsi mencegah agar sel tidak pecah atau mengkerut akibat osmosis (Martin, et.al., 2006). Larutan fiksatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan glutaraldehyd 2%. Larutan glutaraldehyd merupakan larutan fiksatif yang paling umum digunakan untuk mikroskop elektron. Glutaraldehyd menunjang proses fiksatif yang cepat pada *cross-linking* protein sel dengan dialdehyd (Hayat, 1986; Korneev.et.al.,2021). Glutaraldehyd (GA) dapat mempertahankan struktur halus pada sampel hingga tingkat makromolekul dan membuat sampel tahan terhadap berbagai kondisi pemrosesan dalam preparasi SEM sehingga banyak digunakan untuk larutan fiksatif sebagian besar sampel biologis (Mehdizadeh-Kashi, et.al.,2014). Tujuan utama proses fiksasi adalah menjaga kondisi morfologi dari struktur selular agar tetap atau mendekati kondisi aslinya (Korneev.et.al.,2021). Modifikasi pencucian dilakukan dengan penambahan dengan *buffer* fosfat pH 8.0. Penambahan *buffer* fosfat bertujuan untuk mempertahankan pH pada sampel. Waktu pencucian dengan *buffer* fosfat dipercepat menjadi 5 menit pada setiap pencucian sehingga total waktu pencucian adalah 15 menit. Kecepatan sentrifugasi diubah menjadi 2000 x g.

Modifikasi selanjutnya adalah proses *post* fiksasi dengan *osmium tetroxide* pH 7.4 yang tidak dilakukan dalam proses preparasi. *Osmium tetroxide* merupakan salah satu bahan kimia dengan harga mahal. Harga *osmium tetroxide* sebanyak 250 mg adalah SGD 235.00 atau setara dengan Rp. 2,660,235.131 (harga per 7 Agustus 2023) (sigmaaldrich, 2023). *Osmium tetroxide* merupakan larutan *post* fiksatif yang paling umum digunakan dalam protokol standar preparasi SEM. Penggunaan larutan ini sebenarnya dapat menginduksi kerusakan membran plasma, sehingga langkah pasca-fiksasi ini harus dihindari mencegah penurunan kualitas sampel (Ricci et al.,2015; Du et al., 2016; Korneev.et.al., 2021). Larutan fiksatif yang paling baik digunakan untuk menjaga membran plasma pada membran adalah campuran *tannic acid* 0,5% dan glutaraldehyd 3,5% dalam 0,1 M *buffer sodium cacodylate* (Korneev.et.al., 2021).



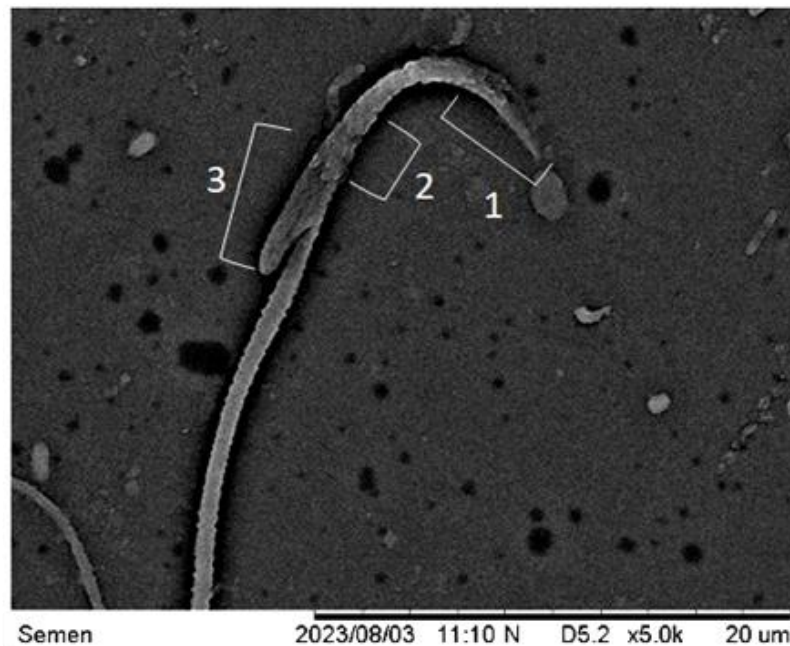
Gambar 1. Kerusakan membran plasma akibat penambahan *osmium tetroxide* pada sel spermatozoa tikus wistar (Korneev.et.al.,2021)

Proses dehidrasi dilakukan dengan etanol bertingkat. Metode sebelum modifikasi tidak mencantumkan konsentrasi etanol bertingkat dan waktu yang sehingga dalam penelitian ini didapatkan konsentrasi etanol dan waktu yang sesuai untuk dehidrasi. Konsentrasi etanol yang digunakan adalah 30%,50%,70%,80%,90%,96% (absolut). Sampel didiamkan selama 5 menit setelah penambahan etanol. Total waktu dalam proses dehidrasi adalah 30 menit. Proses dehidrasi bertujuan untuk menghilangkan air dan cairan pada sampel sebelum dilakukan pengamatan dengan SEM.

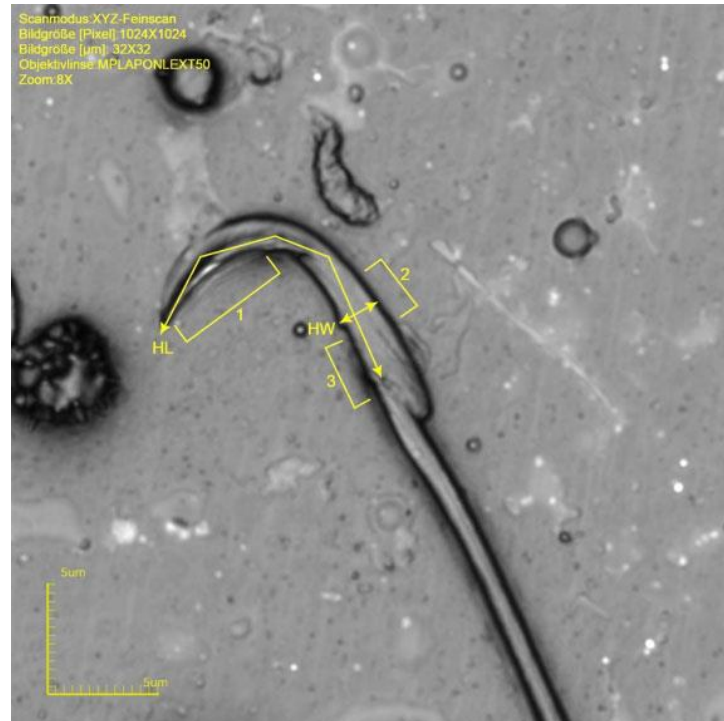
Spermatozoa merupakan salah satu bahan biologis sehingga harus melalui proses dehidrasi. Sampel harus dikeringkan untuk menghindari penyusutan dan kerusakan sampel (Bell, et.al., 1997; Mehdizadeh-Kashi, et.al.,2014). Larutan yang umum digunakan dalam proses dehidrasi adalah methanol, etanol, dan aseton. Etanol dan aseton adalah larutan dehidrasi yang dapat melindungi struktur asli sampel. Proses dehidrasi dilakukan dengan serangkaian alkohol bertingkat dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%,80%, 90%, 95%, dan 100% (Fazel Anvari-Yazdi, et.al., 2013; Mehdizadeh-Kashi, et.al.,2014).Dehidrasi melibatkan prinsip substitusi lambat air dalam sampel dengan pelarut organik. Dehidrasi harus dilakukan dengan cepat untuk mencegah senyawa-senyawa dalam sampel larut dalam alkohol atau aseton secara berlebihan (Mehdizadeh-Kashi, et.al.,2014). Proses pengeringan dilakukan setelah proses dehidrasi untuk menghilangkan pelarut dalam sampel. Kandungan cairan yang masih terdapat dalam sampel dapat menguap di dalam mikroskop sehingga dapat merusak alat. Oleh sebab itu, diperlukan proses pengeringan sampel yang maksimal. Modifikasi pengeringan yang dilakukan adalah menggoyang-goyangkan sampel di atas api bunsen. Saat proses pengeringan diusahakan api dan *cover glass* tidak bersentuhan langsung untuk mencegah sampel kering berlebihan dan terbakar.

Tahapan setelah pengeringan adalah *coating*. Tujuan utama *coating* adalah membuat sampel menjadi konduktif sehingga dapat terlihat kontras saat diamati dengan mikroskop. Sampel biologis merupakan bahan isolator sehingga harus diubah menjadi konduktor agar elektron-elektron dapat terperangkap di dalam sampel. Sampel biologis biasanya dilapisi dengan platina, *gold*, atau *gold-paladium* karena mempunyai ukuran butir yang halus (Mehdizadeh-Kashi, et.al.,2014). Metode *coating* pada penelitian ini menggunakan lapisan *gold* (AU Target) dengan alat Quorum Q150R S. Modifikasi dilakukan pada penggunaan waktu *coating* yaitu 90 detik. Pengamatan SEM dilakukan dengan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM) Hitachi TM3000 diatur 30 kV.

3.2 Hasil Pengamatan Scanning Electron Microscope (SEM) menggunakan Metode yang Dimodifikasi



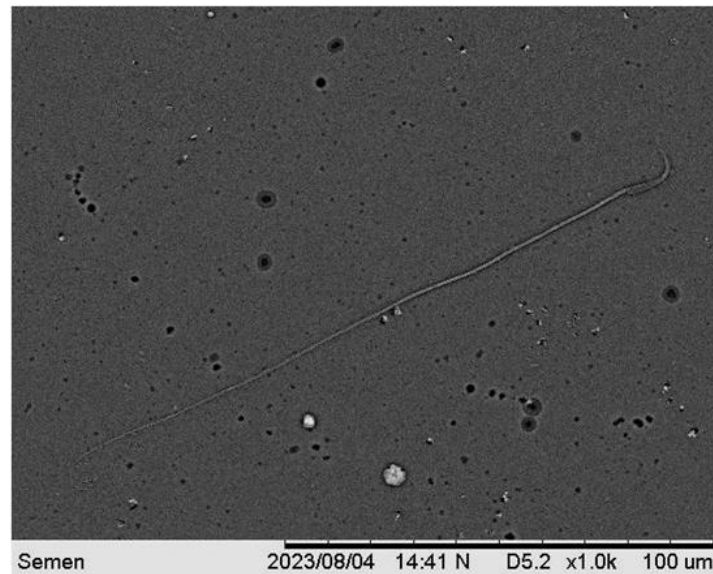
Gambar 2. Hasil Pengamatan SEM bagian kepala *spermatozoa* tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) bagian kepala dengan metode preparasi yang sudah dimodifikasi (perbesaran 5000 x).
Bagian-bagian kepala *spermatozoa* : 1. *Anterior acrosomal* 2. *Segmen equatorial* 3. *Segmen postacrosomal* (Weber, et.al., 2014).



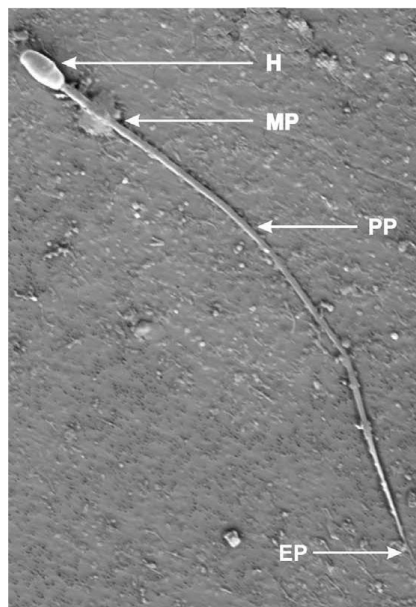
Gambar 3. Bagian-bagian kepala *spermatozoa* tikus wistar jantan (Weber, et.al., 2014).

Berdasarkan Weber,et.al. (2014) kepala *spermatozoa* tikus terbagi menjadi tiga bagian (gambar 2) antara lain : 1. *Anterior acrosomal*, 2. *Segmen equatorial*, 3. *Segmen Postacrosomal*. HL (Head Length) adalah panjang kepala *spermatozoa* dan HW (*Head Width*) adalah lebar pada

segmen equatorial. Hasil pengamatan dengan SEM (gambar 2 dan gambar 4) menunjukkan dengan adanya modifikasi metode pada tahapan fiksasi yaitu dengan penggunaan glutaraldehyd saja dengan konsentrasi 3 % tidak mempengaruhi morfologi pada kepala dan keseluruhan bagian *spermatozoa*. Hasil ini sesuai dengan fungsi glutaraldehyd yaitu menjaga kondisi morfologi dari struktur selular (Korneev.et.al.,2021).

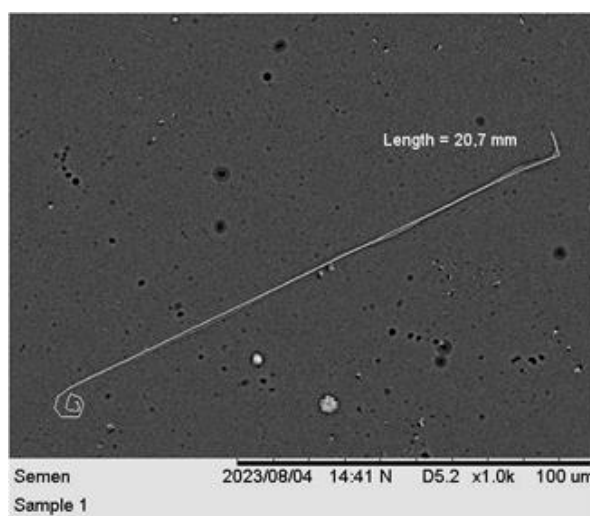


Gambar 4. Hasil pengamatan SEM *spermatozoa* tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) secara keseluruhan dari kepala hingga ekor (perbesaran 1000 x)



Gambar 5. Morfologi eksternal keseluruhan spermatozoatozoa tikus jantan dengan pengamatan SEM (perbesaran 1000 x); H = *Head*, MP = *Mid-Piece*, PP = *Principle Piece*, EP = *End-Piece* (Maswanganye, 2005).

Berdasarkan Maswanganye (2005) bagian-bagian spermatozoatozoa tikus jantan meliputi bagian *head*, *mid-piece*, *principle-piece*, dan *end-piece* (gambar 5). Struktur *spermatozoa* pada mamalia pada dasarnya terdiri dari bagian kepala, leher, dan ekor. Sebagian besar penelitian telah dilakukan dan menunjukkan hasil yang beragam secara struktural diantara hewan pengerat (Breed,1995; Gage 1998; Dubin dkk. 2001; Gallardo dkk.2002; Maswanganye, 2005). Gambar 4 menunjukkan hasil pengamatan SEM dengan perbesaran 1000 x yang menunjukkan keseluruhan bentuk *spermatozoa*, yaitu terdapat bagian kepala, bagian tengah, *posterior*, serta bagian ekor. Proses preparasi berpengaruh dan penting untuk mendapatkan gambar pengamatan yang sesuai. Gambar *spermatozoa* yang utuh dan tanpa debris disebabkan oleh proses dehidrasi yang dilakukan sesuai metode sehingga *spermatozoa* tidak bertumpuk dan tidak ada kerusakan secara teknis. Sampel harus melalui proses dehidrasi untuk menghindari penyusutan dan kerusakan sampel (Bell, et.al., 1997; Mehdizadeh-Kashi, et.al.,2014).



Gambar 6. Hasil pengukuran panjang keseluruhan *spermatozoatozoa* dengan *software imageJ*

Ukuran sampel merupakan salah satu data yang dibutuhkan dalam penelitian. Mendapatkan ukuran yang sesuai menjadi salah satu komponen penting untuk penelitian kualitatif, seperti ukuran keseluruhan, ukuran kepala, hingga ukuran nano partikel. Salah satu tujuan pengamatan *Scanning Electron Microscope* adalah untuk mengetahui ukuran spesimen. Gambar 6 menunjukkan sampel *spermatozoa* yang diukur menggunakan *software imageJ*. Hasil pengukuran panjang *spermatozoa* tikus wistar adalah 20,7 mm. Prakash et.al. (2014) menjelaskan bahwa panjang *spermatozoa* tikus adalah $\pm 160\mu\text{m}$. Hasil gambar pengamatan dan hasil pengukuran spermatozoa dapat diamati secara keseluruhan pada perbesaran tertentu dengan menggunakan metode preparasi sampel *spermatozoa* yang telah dimodifikasi. Hal ini menunjukkan modifikasi metode pada tahapan preparasi, penggunaan bahan kimia, dan waktu preparasi tidak mempengaruhi hasil gambar pengamatan dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM).

4. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah modifikasi metode pada tahapan preparasi, penggunaan bahan kimia, dan waktu preparasi sampel *spermatozoa* dapat mempersingkat waktu dan menghemat biaya preparasi, dan tidak mempengaruhi hasil gambar pengamatan dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM).

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih kepada PLT Direktur Institut Biosains, rekan-rekan kerja di Institut Biosains atas dukungannya dalam penulisan artikel ilmiah ini, teman-teman PLP se-Indonesia, serta panitia Semnas PPLPI 2023 yang telah memberikan kesempatan untuk menulis artikel ilmiah ini..

Daftar Pustaka

- Akhtar K., Khan S. A., Khan S. B., & Asiri, A. M. 2018. Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. *Handbook of Materials Characterization*, 113–145.
- Bhattacharya Raktim., Saha Sulagna., Kostina Olga., Muravnik Lyudmila & Mitra Adinpunya. 2020. Replacing Critical Point Drying With A Lowcost Chemical Drying Provides Comparable Surface Image Quality of Glandular Trichomes from Leaves of *Millingtonia hortensis* L. f. in *Scanning Electron Micrograph*. 2020. *Applied Microbiology Springer Open* (50:15).
- Korneev Denis., Merriner D.Jo., Gervinskas Gediminas., de Marco Alex., & O'Bryan Moira.K.2021. New Insights Into Sperm Ultrastructure Through Enhanced Scanning Electron Microscopy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9:672592, 1-13.
- Mehdizadeh-Kashi, A., Kobra Tahermanesh., Shahla Chaichian., Mohammad Taghi J., Fateme Moradi., Seyed Mohammad.T., Ashraf Sadat M.N., Nasrin L., Shahram Pour B., Abbas Fazel Anvari-Yazdi., Seyedeh Mehr A. 2014. How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). *Galen Medical Journal* 3 (2), 63-80.
- Martin, N.C., Pirie A.A., Ford, L.V., Callaghan, C.L., McTurk, K., Lucy,D., & Scringer, D.G. 2006. The Use of Phospatase Buffered Saline for the Recovery of Cells and Spermatozoatozoa from Swabs. *Science & Justice* 46 (3), 179-184.
- Mascorro Jose A., & Bozzola John. J. .2007. Processing Biological Tissues for Ultrastructural Study. *Electron Microscopy*, 19–34.
- Maswanganye,K.P., G.P. Malherbe & N.C. Bennett. 2005. Ultrastructure of epididymal spermatozoatozoa in three social African mole-rats of the genus *Cryptomys* (Rodentia: Bathyergidae): conservatism in sperm morphology, *African Zoology*, 40:2, 293-300
- Nussdorfer Petra., Cilensšek Ines., Zorn Branko., Petrovič Daniel.2018. Adapted Methods for Scanning Electron Microscopy (SEM) in Assessment of Human Sperm Morphology. *Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences*, 43-48.
- Prakash Seppan., Elumalai Prithiviraj., Sekar Suresh., Nagella V.L.M., Mohanraj K.G., Murugesan A., Lakshmanan G., Premavathy D.2014. Morphological Diversity of Sperm: A Mini Review. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* Vol. 12. No. 4. pp: 239-242.
- sigmaaldrich. 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/search/osmium-tetroxide?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=osmium%20tetroxide&type=product> (diakses 7 Agustus 2023).
- Wael A.Khalil, Mostafa A.El-Harairy, Alaa E.B Zeidan, Mahmoud A.E. Hassan & Omnia Mohey-Elsaeed. 2018. Evaluation of Bull Spermatozoatozoa During and After Cryopreservation: Structural and Ultrastructural Insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 6, S49-S56.
- Webber Klaus., Alexander Waletzky., Diana Fendl., Patricia O., Pradeep T., Felix Hein., Wolfram Riedel., Andres Ko" nig., Marc Kunze., Anne-Laure Leoni., Javier Rivera., Roberto Quirici., Ivano Romano., Susanne Paepke., Yoshimasa Okazaki., Jerry F. Hardisty. 2014. New Method for Sperm Evaluation by 3-Dimensional Laser Scanning Microscopy in Different Laboratory Animal Species. *International Journal of Toxicology* 2014, Vol. 33(5) 353-361.
- Wuwungan Cynthia., de Queljoe Edwin., Wewengkang Defny.S. 2017. Kualitas Spermatozoatozoa Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus* L.) Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper Betle* L.). *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*. Vol. 6 No. 3 Agustus 2017, 324-331.