BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Embrio

2.1.1 Proses Terbentuknya Embrio

1. Ovulasi

Ovulasi merupakan hasil gabungan dari hipotalamus, kelenjar pituitari, dan ovarium. Hipotalamus memulai proses ovulasi dengan melepaskan *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) secara perlahan. Pelepasan perlahan ini menyebabkan kelenjar pituitari anterior melepaskan Luteinizing Hormon (LH) dan *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH), yang kemudian bekerja pada folikel ovarium. Folikel ini terdiri dari 3 sel penting yaitu theca, granulosa, dan oosit. LH menyebabkan sel-sel theca menghasilkan androstenedion. Androstenedion kemudian diubah menjadi estradiol melalui aromatase, yang dirangsang oleh FSH. Setelah mencapai konsentrasi kritis estradiol, umpan balik negatif pada LH yang biasanya terjadi oleh estrogen dimatikan, dan mulai memberikan umpan balik positif pada pelepasan LH, yang menyebabkan "lonjakan LH," yang memulai ovulasi. Setelah ovulasi terjadi, folikel menjadi korpus luteum (Nedresky & Singh, 2022)

2. Fertilisasi

Pergerakan sperma dari serviks ke tuba uterina terjadi akibat kontraksi otot uetrus dan tuba uterine dan sedikit dibantu oleh dorongan sperma. Saat spermamatozoa sampai di saluran genitalia wanita harus mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom untuk dapat memfertilisasi oosit. Fase fertilisasi meliputi fase I (penetrasi korona radiata), Fase II (penetrasi zona pellusiada), Fase III (penyatuan

membrane oosit dan sperma). Hasil utama fertilisasi adalah pengembalian jumlah diploid kromosom, penentuan jenis kelamin individu baru, inisiasi pembelahan. (Sadler, 2019)

3. Pembelahan

Ketika zigot mencapai tahap dua sel, zigot akan mengalami pembelahan mitosis, yang meningkatkan jumlah sel. Sel sel ini yang menjadi lebih kecil setiap kali pembelahan, dikenal dengan blastomere. Sekitar 3 hari setelah ferlitisasi akan terbentuk morula yang terdiri dari 16 sel. Sel-sel bagian dalam morula membentuk massa sel dalam (*inner cell mass*) dan sel-sel di sekelilingnya membentuk massa sel luar (*outer cell mass*) yang membentuk trofoblas, yang kemudian berkembang menjadi plasenta (Sadler, 2019)

4. Pembentukan Blastokista

Saat morula masuk ke rongga uterus, cairan mulai menembus zona pelusida masuk ke dalam ruang interselular massa sel dalam. Secara bertahap, ruang interselular menjadi konfluen, dan pada akhirnya, terbentuk sebuah rongga, blastokel. Pada saat ini, mudigah disebut blastokista. Sel-sel massa sel dalam, yang sekarang disebut embrioblas, berada di satu kutub, dan sel-sel massa sel luar, atau trofoblas, memipih dan membentuk dinding epitel blastokista. Zona pellusida menghilang, memungkinkan dimulainya implantasi (Sadler, 2019)

1.1.2 Perkembangan Embrio

1. Embrio Day-1

Pada hari ke 1 setelah terjadi ovulasi oosit sudah siap untuk melakukan pembuahan, yang terjadi sekitar 12 hingga 24 jam pasca ovulasi. Berikutnya terjadi

tahap pronuklei jantan dan betina. Setelah itu poros pembelahan mitosis pertama dimulai. *Two-cell stage* terbentuk sekitar 30 jam setelah pembuahan. (Sadler, 2019)

2. Embrio Day-3

Pada hari ke 3 morula mengandung 12 hingga 16 blastomer. Tahap morula mencapai lumen rahim kira kira 3 sampai 4 hari. Pada hari ke 4,5 zona pelusida - kaudal axis terbentuk mendekati waktu implantasi pada hari 5,5 hingga hari ke 6 (Sadler, 2019)

3. Embrio Day-5

Embrio hari ke-5 terbentuk late blastocyst. Menjelang waktu implantasi pada hari ke 5,5 hingga 6, sel-sel hipoblas bergerak membentuk lapisan di bagian ventral epiblas dan berdekatan dengan rongga blastokista. Selain itu, beberapa sel di hypoblast membentuk anterior visceral endoderm (AVE), dan sel-sel ini bermigrasi ke ujung tengkorak embrio di masa depan. Di sini, mereka akan memberi sinyal pada sel epiblas di dekatnya untuk membentuk struktur tengkorak. Fase awal implantasi, blastokista berumur sekitar 6 hari (Sadler, 2019)

2.1.3 Faktor Yang Mempengaruhi Perkembangan Embrio

Faktor faktor yang mempengaruhi perkembangan embrio terdiri dari factor paternal dan maternal. Tahap-tahap yang sangat awal ini bergantung hampir sepenuhnya pada kapasitas perkembangan oosit untuk mengatur urutan peristiwa yang memandu zigot dari kontrol maternal ke embrio. Setelah pembuahan, dekondensasi kromatin paternal, demetilasi dan fusi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) pronuklei (PN), pemrograman ulang epigenetik, *Estimated Gestational Age* (EGA), dan pembelahan sel embrio awal adalah proses utama di bawah kendali faktor maternal (Innocenti et al., 2022)

Faktor paternal dari Seminal Plasma (SP) dan sperma menyumbangkan banyak faktor yang membentuk embriogenesis. Faktor-faktor yang diturunkan dari laki-laki ini termasuk kontribusi dari SP, sentriol pihak ayah, *Ribonucleic Acid* (RNA) dan protein, serta integritas DNA. Selain itu, perubahan epigenetik berdampak pada saluran reproduksi wanita, pembuahan, dan tahap awal perkembangan embrio (Vallet-Buisan et al., 2023)

1.2 Sperma

2.2.1 Definisi sperma

Spermatozoa merupakan sel memanjang, terdiri dari kepala yang mengandung inti dan ekor yang mengandung perangkat yang diperlukan untuk motilitasnya(Agustinus et al., 2018). Spermatozoa membutuhkan peran organ lain dari sistem reproduksi pria. Pada saat diejakulasikan, spermatozoa akan bergabung dengan seminal plasma yang dihasilkan oleh beberapa kelenjar tambahan. Spermatozoa hanya menyusun 2–5% dari ejakulat ini, selebihnya merupakan seminal plasma (Agustinus et al., 2018). Di dalam spermatozoa terdapat informasi genetik sifat penurunan ayah dalam molekul DNA (Syauqy et al., 2014)

2.2.2 Spermatogenesis Dan Faktor Faktor Yang Mempengaruhi

1. Spermatogenesis

Keseluruhan proses spermatogenik diperkirakan memerlukan waktu sekitar 74 hari. namun penelitian yang lebih baru pada pria normal menyimpulkan bahwa total waktu untuk memproduksi sperma ejakulasi bervariasi antara 42 hingga 76 hari. Perkiraan produksi sperma harian per pria berkisar antara 150 hingga 275 juta spermatozoa (Neto et al., 2016).

Spermatogenesis terjadi di dalam tubulus seminiferus, dimulai dari pembelahan sel punca yang bersifat diploid dan berakhir dengan pembentukan spermatozoa matur yang haploid. Proses ini dapat dibagi menjadi empat fase sebagai berikut(Agustinus et al., 2018).

A. Proliferasi mitosis dan diferensiasi spermatogonia (spermatogoniogenesis dan spermatositogenesis).
B. Pembelahan meiosis, yaitu pembelahan spermatosit menjadi spermatid. Pembelahan meiosis merupakan proses penting di mana terjadi rekombinasi material genetik dan reduksi kromosom. Profase meiosis pertama merupakan fase terpanjang dalam proses meiosis. Fase ini berlangsung 1–3 minggu, sementara keseluruhan fase lainnya diselesaikan dalam waktu 1–2 hari. Dari spermatogonium B, spermatosit preleptopten dihasilkan sebelum permulaan pembelahan meiosis. Sel ini memulai menggandakan kromosomnya (2n /4C), kemudian terus mengalami berbagai fase hingga fase pachiten yang ditandai oleh sintesis RNA yang intensif. Spermatosit sekunder merupakan hasil dari pembelahan meiosis pertama yang mengandung kromosom haploid dalam kondisi terduplikasi (n/2C). Selama meiosis 2, spermatosit membelah menjadi spermatid yang haploid (n/C). Spermatid baik *round* maupun *elongated* mengandung kromosom haploid sehingga sudah memiliki semua informasi yang dibutuhkan untuk fertilisasi. Sejak era ICSI, meskipun lebih sulit dan memiliki angka keberhasilan yang rendah, round spermatid dapat digunakan untuk membuahi oosit.
C. Spermiogenesis, yaitu perubahan spermatid menjadi spermatozoa. Spermiogenesis merupakan proses diferensiasi sel yang berlangsung kira-kira

tiga minggu. Proses ini terdiri dari empat fase, yaitu golgi, cap, akrosom dan maturasi. Pada tahap ini terjadi pembentukan akrosom, pemanjangan spermatid, kondensasi inti, pembentukan mid piece dan ekor, serta reduksi volume sitoplasma.

D. Spermiasi, pelepasan spermatozoa dari epitel germinal menuju lumen tubulus.

Faktor yang secara langsung mempengaruhi proses spermatogenesis adalah obesitas, diabetes, bahan kimia lingkunga, varikokel, dan factor genetic (Neto et al., 2016).

2.2.3 Struktur Sperma

Menurut WHO tahun 2010 sperma normal memiliki panjang kepala 4,1 µm (kisaran 3,7–4,7 µm), lebar 2,8 µm (kisaran 2,5–3,2 µm), dan rasio aspek 1,5 (kisaran 1,3–1,8) (Itoi et al., 2022). Sperma bergerak dengan gerakan berenang. Sperma manusia berenang ke depan hanya dengan menggerakkan ekornya secara simetris dari sisi ke sisi. Pola berenang sperma sangat dipengaruhi oleh kekentalan pergerakan cairan. (Kumar & Singh, 2021)

A. Kepala

Kepala spermatozoa bentuknya bulat telur dengan ukuran panjang 5 mikron, diameter 3 mikron dan tebal 2 mikron yang terutama dibentuk oleh nukleus yang mengandung informasi genetik sifat penurunan ayah dalam molekul DNA. Pada bagian anterior kepala spermatozoa terdapat akrosom, suatu struktur yang berbentuk topi yang menutupi dua per tiga bagian anterior kepala dan mengandung sejumlah enzim hidrolitik. Enzim tesebut terdiri dari; hialuronidase, akrosin, dan Corona Penetrating Enzim (CPE) yang semuanya penting untuk penembusan ovum (sel telur) pada proses fertilisasi (Syauqy et al., 2014).

B. Flagella / Tail

Ekor sperma ditutupi oleh aksonem di seluruh panjangnya bersama dengan struktur tambahan di sekitarnya yang dikenal sebagai struktur periaksonema, kecuali bagian ujung pendek yang tidak memiliki struktur periaksonema. Bagian ujungnya hanya memiliki aksonema yang dikelilingi oleh membran plasma. Secara mikroskopis, aksonema merupakan struktur berbasis mikrotubulus yang terdiri dari sembilan mikrotubulus doublet luar dan satu doublet pusat yang dihubungkan dengan jari-jari radial dan lengan dynein. Lengan dynein adalah perangkat kekuatan yang ada di aksonema, yang bertanggung jawab atas pergerakan ekor sperma (Kumar & Singh, 2021)

Struktur peri-axonemal pada bagian tengah terdiri dari selubung mitokondria. Struktur peri-axonemal lainnya di bagian tengah adalah serat padat luar / *Outer Dense Fibers* (ODF). Fungsi utama ODF ini adalah untuk melindungi ekor sperma dari kerusakan yang disebabkan oleh gaya geser selama pengangkutannya melalui epididimis dan selama ejakulasi. ODF juga memainkan peran penting dalam motilitas dan kapasitasi sperma (Kumar & Singh, 2021)

C. Kriteria Morfologi Spema Normal

Volume dan kandungan sperma ejakulat bergantung pada lama waktu antar-ejakulasi. Volume rerata semen adalah 2,75 mL, berkisar dari 2 hingga 6 mL, dengan volume yang lebih banyak setelah abstinensia. Ejakulat manusia rerata mengandung sekitar 165 juta sperma (60 juta/mL), tetapi sebagian ejakulat mengandung hingga 400 juta sperma (Shewood, 2016).

2.2.4. Jenis Kelainan Pada Sperma

Jenis utama dari cacat sperma abnormal adalah: kepala, leher, ekor dan sisa sitoplasma berlebih namun kelainan kepala memainkan peran utama dalam infertilitas pria (Iqbal, Mustafa and Ma, 2020). Jenis gangguan sperma:

1. Azoospermia adalah kondisi medis yang ditandai dengan tidak adanya sperma dalam ejakulasi pria.
2. Oligozoospermia: konsentrasi sperma berada di bawah batas acuan bawah yaitu 15 juta sperma/mL ejakulasi (Choy & Amory, 2020)
3. Oligoastheno: Kombinasi oligospermia dengan asthenospermia
4. Oligoterato:Kombinasi oligospermia dengan teratispermia
5. Severe oligo: sperma <1jt/mL pada ejakulasi
6. Asthenozoospermia: Kondisi sperma memiliki motilitas yang buruk (Shahrokhi et al., 2020)
7. Asthenoterato: Kombinasi asthenosperma dengan teratosperma
8. Teratozoospermia: persentase secara morfologis spermatozoa normal di bawah batas normalnya (Coutton et al., 2014)
9. Oligoasthenoteratozoospermia (OAT syndrome)**:** Kombinasi dari oligospermia, asthenospermia, dan teratospermia, yang menunjukkan adanya masalah jumlah, motilitas, dan bentuk sperma secara bersamaan.
10. Severe OAT: Kombinasi dari oligospermia, asthenospermia, dan teratospermia yang lebih parah
11. Necrozoospermia: spermatozoa yang hidup kurang dari 58% dalam air mani pria (Agarwal et al., 2022)

12. Hyperspermia: volume air mani lebih dari 6,3 ml (Markus Christian Hartanto et al., 2024)
13. Cryptozoospermia: Cryptozoospermia merupakan penyakit oligozoospermia ekstrim dengan efek pengobatan yang tidak memuaskan (Liu et al., 2023)
14. Pyospermia: Kondisi di mana sperma mengandung jumlah abnormal sel-sel putih (sel darah putih) (Velez et al., 2021)

2.3 IVF (In Vitro Fertilization)

2.3.1 Definisi

IVF merupakan proses pembuahan sel telur wanita oleh sperma pria yang terjadi di luar tubuh yang dilakukan di laboratorium, sehingga dikenal secara awal sebagai metode bayi tabung. Metode IVF ini merupakan teknologi terkini dalam penanganan infertilitas dengan angka keberhasilan yang tinggi. Di Indonesia, hingga saat ini, persentase terjadinya kehamilan setelah penanaman embrio, mencapai 35%. (Putra & Abrar, 2022).

2.3.2 Prosedur

Proses pelaksanaan bayi tabung dapat dilakukan dalam beberapa tahap yaitu (Hendarto H, 2019):

1. *Controlled Ovarian Hyperstimulation*/Stimulasi Ovarium Terkontrol

   Terdapat tiga elemen yang dilakukan secara berurutan, yaitu:

   a. Pemberian gonadotropin eksogen untuk menstimulasi perkembangan multi-folikel.

b. Pemberian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist atau antagonists untuk mensupresi fungsi hipofisis dan mencegah ovulasi prematur.

c. Memicu maturasi final oosit, dilakukan 36 jam sebelum prosedur petik sel telur.

Dikenal teori FSH window/threshold yang menekankan perlu kadar FSH serum melebihi nilai ambang batas agar dapat meginduksi aktivitas ovarium. Peningkatan kadar FSH 10- 30% di atas nilai ambang akan menstimulasi perkembangan folikel normal, sedangkan peningkatan suprafisiologis akan memicu stimulasi eksesif. Protokol stimulasi ovarium untuk FIV didesain untuk menghasilkan jumlah oosit multipel

2. *Ovum Pick-Up*/Petik Sel Telur

Merupakan prosedur pengambilan oosit menggunakan jarum aspirasi dengan tuntunan USG transvagina. Prosedur ini dilakukan di kamar operasi dengan bantuan pembiusan. Petik sel telur merupakan prosedur sensitif karena sangat terkait dengan kegiatan di laboratorium untuk penanganan oosit. Perhatian khusus perlu ditujukan pada suhu, pH dan waktu antara petik sel telur dan kultur oosit harus minimal.

3. Preparasi Sperma

Tujuan preparasi sperma adalah: 1) mengeliminasi plasma seminalis, debris dan kontaminan, 2) menyiapkan sperma dengan motilitas progresif, 3) menghindari sperma morfologi abnormal. Sampel sperma dikoleksi, dimasukkan ke dalam kontainer steril dan dipreparasi di laboratorium dengan menghindari suhu ekstrem (< 20°C dan > 37°C).

4. Inseminasi Oosit/Fertilisasi dan Kultur

   Inseminasi oosit dapat dilakukan dengan cara konvensional atau teknik ICSI. Pada cara konvensional dipersiapkan sperma dengan motilitas progresif konsentrasi antara 0.1 and 0.5x105/ ml. Suspensi sperma sebaiknya di dalam medium sesuai dengan kultur oosit, dan medium fertilisasi sebaiknya berisi glukosa agar fungsi sperma bagus. Inkubasi oosit dan sperma dilaksanakan dalam waktu semalam. Identifikasi gamet saat inseminasi wajib dilakukan secara "double check".

5. Transfer Embrio

   Merupakan prosedur kritis dalam FIV, yaitu memasukkan embrio hasil kultur kedalam uterus. Pelaksanaan transfer embrio dilakukan dengan tuntunan USG transabdomen dan penggunaan kateter lunak lebih diutamakan.

2.4 ICSI

2.4.1 Definisi

ICSI merupakan teknik fertilisasi dilakukan dengan cara menginjeksikan secara mekanik satu sperma ke dalam oosit secara in vitro agar terjadi fertilisasi (Hendarto H, 2019). Metode ICSI menggunakan pembesaran 400x menggunakan kontras modulasi hoffman (Fadel et al., 2014)

2.4.2 Prosedur

a. Persiapan Oosit

Superovulasi dilakukan sebelum pengambilan oosit untuk memperoleh lebih banyak oosit dari pasien. Oosit yang dikumpulkan dari pasien dengan berbagai metode dipindahkan ke HEPES/CZB, Whitten's/PVA/HEPES, atau media TCM

199 komersial yang mengandung 0,1% hialuronidase, dipanaskan hingga 37°C. Pada akhir proses pengambilan oosit, residu jaringan yang terbentuk dikeluarkan dari media dan dalam waktu 5 menit, sel kumulus mulai terpisah dari sel oosit dengan pengaruh enzim hialuronidase. Oosit yang dipisahkan dari sel kumulus dicuci dengan bantuan mikropipet dengan mengambil HEPES-CZB bebas hialuronidase, Whitten's/ Tetes HEPES/PVA atau TCM 199, dan oosit yang belum matang, terfragmentasi, dan tampak abnormal dibuang. Pada langkah terakhir, oosit yang dipilih ditempatkan dalam inkubator 38,5°C dengan 5% CO2 dalam medium CZB, Whitten's/PVA atau TCM 199 dan dibiarkan untuk pematangan(Öztür et al., 2023).

b. Persiapan Pipet

Dua jenis pipet digunakan untuk melakukan ICSI, yaitu pipet penahan dan pipet manipulator. Pipet manipulator berfungsi untuk menusuk zona pelusida dan melepaskan spermatozoa ke dalam sel. Karena alasan ini, ujung pipet manipulator disiapkan dalam bentuk kerucut(Öztür et al., 2023).

c. Persiapan Sperma

Sperma yang dicampur dengan 0,5 mL medium T6 dalam tabung mikrocentrifuge 1,5 mL disentrifugasi pada 1800 rpm selama 5 menit. Pada akhir sentrifugasi, supernatan atas dibuang dan sisanya disuspensikan kembali dengan 20-50 µL medium T6. 2-4 µL semen yang diambil dari suspensi dipindahkan ke 1 g/10 ml larutan polyvinylpyrrolidone (PVP) yang akan digunakan(Öztür et al., 2023)

d. Immobilisasi Spermatozoa

Dari spermatozoa yang dipindahkan, diambil 10 spermatozoa yang dianggap baik dan dipindahkan ke dalam tetes-tetes PVP yang lain. Spermatozoa yang dipindahkan ke dalam tabung PVP yang kedua terlebih dahulu ditarik ke dalam pipet mulai dari ekornya dan kepalanya dibiarkan keluar sehingga lehernya berada di ujung pipet. Kepala dan ekor dipisahkan satu sama lain dengan cara menekan leher dengan ujung mikropipet. Prosedur yang sama dilakukan pada semua spermatozoa dan pada akhir prosedur, kepala spermatozoa ditarik ke dalam mikropipet manipulator dan disiapkan untuk disuntikkan (Öztür et al., 2023)

e. Injeksi Sperma

Mula-mula, dengan menggunakan alat mikromanipulator dan mikroskop oosit matur dipegang dengan alat khusus, kemudian dengan menggunakan jarum ukuran mikro, tajam, dan berlubang diambil satu sperma yang sebelumnya dilakukan imobilisasi. Jarum tersebut kemudian diinjeksikan secara hati-hati melalui cangkang oosit dan masuk ke dalam sitoplasma (Hendarto H, 2019)

Setelah proses penyuntikan selesai, yang bertahan hidup dipilih dari sampel yang disimpan pada suhu kamar selama 1 jam dan dipindahkan ke tetes kultur yang disiapkan berdasarkan CZB, Synthetic Oviduct Fluid (SOF) atau Charles Rosenkrans (CR), dan perkembangannya diamati pada suhu 38,5 °C dalam lingkungan yang mengandung 5% CO2 (Öztür et al., 2023)

f. Aktivasi Oosit

Ada tiga jenis metode aktivasi buatan untuk aktivasi oosit: aktivasi mekanis, elektrik, dan kimia. Aktivasi secara mekanis ini berdasarkan tusukan zona pelusida untuk memastikan masuknya kalsium ke dalam oosit. Aktivasi kimia dilakukan

dengan menambahkan beberapa zat kimia yang meningkatkan kalsium dalam oosit ke media kultur setelah mikroinjeksi. Aktivasi elektrik dilakukan selama mikroinjeksi, gelombang listrik bertegangan rendah diberikan ke oosit, menyebabkan kalsium dalam retikulum endoplasma oosit keluar. Pada saat yang sama, listrik yang diberikan juga mengubah struktur fosfolipid dalam membran sel, menyebabkan saluran kalsium di pori-pori sel terbuka (Öztür et al., 2023).

2.4.3 Faktor Kegagalan ICSI

Penyebab utama kegagalan pembuahan setelah ICSI disebabkan oleh tidak adanya aktivasi ooplasma yang diamati pada 40-70% oosit yang disuntikkan, ketidakmampuan spermatozoa untuk menyediakan faktor pengaktif. Fusi sperma-oolemma dilewati oleh ICSI, sehingga memungkinkan spermatozoa tanpa akrosome berkepala bulat untuk melakukan pembuahan (Maggiulli et al., 2010). Tingginya kadar seminal interleukin (IL) -18 berhubungan positif dengan risiko kegagalan kehamilan yang lebih besar pada wanita yang terpapar plasma mani (SP) pasangannya selama fertilisasi in vitro (FIV)/injeksi sperma intracytoplasmic (siklus ICSI) (Nikolaeva et al., 2021)

2.5. IMSI

2.5.1 Definisi

Kombinasi teknik *Motile Sperm Organelle Morphology Examination* (MSOME) dengan mikromanipulasi sistem telah memungkinkan pengenalan yang dimodifikasi Prosedur ICSI, disebut injeksi sperma yang dipilih secara morfologis intrasitoplasma (IMSI) (Mangoli & Khalili, 2020).

2.5.2 Prosedur

Seleksi sperma untuk injeksi mikro telah dicapai pada pembesaran ×6000 (Moubasher et al., 2021)

1. Satu ml alikuot suspensi sel sperma dipindahkan ke mikrotetesan 5 ml media HTF termodifikasi yang mengandung larutan polivinil pirolidin 10% yang mengandung 5% albumin serum manusia (medium PVP Irvine Scientific, USA). Mikrodroplet ini ditempatkan dalam piring kaca steril (Fluoro Dish wellcon BV Netherland-Amestrdam) di bawah minyak parafin steril (Light mineral oil, Irvine USA). Sel sperma yang tersuspensi dalam micro droplet ditempatkan di atas panggung mikroskop di atas lensa objektif minyak Uplan Apo 100/1,35 yang sebelumnya ditutup dengan setetes minyak imersi (Fadel et al., 2014)
2. Dinilai dengan mikroskop kontras interferensi nomarski dengan kamera Leica DFC-280 (Leica Microsystems, Nanterre, Perancis) menambahkan mikroskop Leica DMI 6000. Spermatozoa yang mempunyai luas vakuola relatif terkecil adalah berpotensi dipilih (Moubasher et al., 2021)

Spermatozoa yang digunakan untuk IMSI diklasifikasikan menjadi 5 kelompok:

1. Derajat I terdiri dari spermatozoa yang bebas dari kelainan morfologi (Spermatozoa normal). Spermatozoa diklasifikasikan sebagai normal secara morfologi jika spermatozoa menunjukkan nukleus dan akrosom yang normal, lamina pasca-akrosom, leher, ekor dan mitokondria, selain itu tidak terdapat tetesan sitoplasma atau sitoplasma di sekitar kepala. Untuk inti, keadaan morfologi ditentukan oleh bentuk dan kandungan kromatin. Kriteria normalitas bentuk inti adalah konfigurasi halus, simetris dan oval. Bentuk inti dianggap

abnormal jika ekstrusi atau invaginasi massa kromatin inti telah terdeteksi (malformasi regional bentuk inti). Kandungan kromatin dianggap abnormal jika satu atau lebih vakuola diamati menempati lebih dari 4% area inti. Sebuah inti dianggap normal jika bentuk inti dan kandungan kromatinnya normal. Jika spermatozoa Tingkat I tidak tersedia atau jumlahnya tidak mencukupi untuk injeksi, spermatozoa diklasifikasikan berdasarkan bentuk kepala sebagai derajat II.

2. Derajat II: oval besar: (5,31 mm), oval kecil (4,19 mm), lebar (lebar >3,7 mm) atau sempit (< lebar 2,9 mm).
3. Derajat III: adanya kelainan regional.
4. Derajat IV: adanya vakuola besar pada 5-50% permukaan kepala.
5. Derajat V: adanya vakuola besar pada >50% permukaan kepala. Teknisi yang sama, tidak mengetahui identitas subjek, melakukan semua seleksi sperma. Waktu yang diperlukan dalam langkah seleksi adalah 30 menit/sampel. Setidaknya lima spermatozoid dipilih untuk setiap oosit MII. Setelah seleksi sperma, injeksi mikro dilakukan dengan cara yang sama seperti di ICSI. Spermatozoid masih bergerak ketika ditangkap untuk seleksi akhir.