

Kualitas Spermatozoa Epididimis Anjing selama Penyimpanan pada Suhu 4°C

M.A. SETIADI¹, YULNAWATI² dan A. SUPRAYOGI³

¹ Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (IPB)
Jl. Agatis Kompleks Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680

² Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI),
Jl. Raya Bogor-Jakarta Km 46, Cibinong, 16911

³ Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (IPB)
Jl. Agatis Kompleks Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680

(Diterima dewan redaksi 26 Maret 2007)

ABSTRACT

SETIADI, M.A., YULNAWATI and A. SUPRAYOGI. 2007. Quality of canine epididymal spermatozoa during storage at 4°C. *JITV* 12(2): 134-138.

The aim of this present study was to investigate the quality of canine epididymal spermatozoa during storage at 4°C. Spermatozoa was collected by flushing technique with physiological saline (NaCl 0.9% w/v) and diluted in modified Tris based extender containing 20% (v/v) of egg yolk for three days. The result showed that mean concentration of spermatozoa from cauda epididymal was $95.29.10^6$ spz/ml. The percentage of progressive motility and membrane integrity of spermatozoa on time of collection was 70.71% and 72.85%, respectively. Quality of epididymal spermatozoa was decreased significantly ($P < 0,05$) during storage at 4°C. The percentage of progressive motility during storage were 70.71% on day 0 (H-0, after diluted), 60.71% (H-1), 45.71% (H-2), and 33.57% (H-3). The percentage of membrane integrity during storage were 72.85, 68.88, 61.06 and 47.47% on H-0, H-1, H-2 and H-3, respectively. In conclusion, quality of canine epididymal spermatozoa was decreased during three days of storage at 4°C.

Key Words: Epididymal Sperm, Storage, Canine

ABSTRAK

SETIADI, M.A., YULNAWATI dan A. SUPRAYOGI. 2007. Kualitas spermatozoa epididimis anjing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *JITV* 12(2): 134-138.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui kualitas spermatozoa asal epididimis anjing selama penyimpanan pada suhu 4°C. Spermatozoa dikoleksi dengan teknik pembilasan (*flushing*) menggunakan larutan NaCl fisiologis (0,9% w/v) dan disimpan dalam medium pengencer Tris kuning telur 20% (v/v) selama 3 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi rata-rata spermatozoa yang berasal dari cauda epididimis anjing adalah sebesar $95,29.10^6$ spz/ml. Persentase motilitas progresif dan membran plasma utuh (MPU) spermatozoa epididimis pada saat koleksi masing-masing adalah 70,71 dan 72,85%. Kualitas spermatozoa selama penyimpanan menunjukkan adanya penurunan secara nyata ($P < 0,05$). Persentase motilitas progresif selama penyimpanan secara berturut-turut adalah 70,71% (H-0), 60,71% (H-1), 45,71% (H-2) dan 33,57% (H-3). Sementara itu, % MPU setelah penyimpanan adalah 72,85, 68,88, 61,06 dan 47,47% secara berturut-turut pada H-0, H-1, H-2 dan H-3. Dapat disimpulkan bahwa kualitas spermatozoa epididimis anjing mengalami penurunan selama penyimpanan pada suhu 4°C.

Kata Kunci: Spermatozoa Epididimis, Penyimpanan, Anjing

PENDAHULUAN

Banyak spesies carnivora yang mengalami ancaman kepunahan akibat perburuan liar dan kehilangan habitat aslinya. Aplikasi teknologi reproduksi merupakan salah satu usaha untuk dapat mengatasi permasalahan tersebut. Dengan demikian, hewan yang mati mendadak ataupun mengalami gangguan fungsi reproduksi masih dapat digunakan sebagai sumber materi genetik yang akan menghasilkan individu baru dengan memanfaatkan gonad yang dimiliki. Anjing merupakan

salah satu jenis carnivora yang banyak dipelihara sebagai hewan kesayangan dan dapat digunakan sebagai hewan model dalam penelitian pemanfaatan materi genetik yang berasal dari epididimis untuk mencegah kepunahan jenis carnivora lainnya.

Epididimis merupakan bagian yang melekat pada testis dan berfungsi sebagai tempat pematangan dan penyimpanan spermatozoa sebelum ejakulasi. Koleksi spermatozoa dari epididimis merupakan suatu metode alternatif untuk mendapatkan spermatozoa hidup dari hewan jantan yang tidak dapat ejakulasi maupun dari

hewan yang telah mati (AXNER, 2004; SILVA *et al.*, 2004). Di dalam epididimis, spermatozoa telah mengalami proses pematangan, sehingga spermatozoa yang dikoleksi dari cauda epididimis dapat digunakan untuk proses fertilisasi dan memiliki kemampuan membuahi seperti halnya spermatozoa yang berasal dari ejakulasi (HAFEZ dan HAFEZ, 2000). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa spermatozoa asal epididimis dari berbagai jenis hewan seperti babi (KIKUCHI *et al.*, 1998), domba (RIZAL *et al.*, 2004), kerbau (HEROLD *et al.*, 2004) dan kucing (YULNAWATI dan SETIADI, 2005), memiliki kualitas yang hampir sama dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Oleh karena itu, spermatozoa yang berasal dari epididimis juga dapat digunakan untuk aplikasi berbagai teknik reproduksi bantuan seperti Inseminasi Buatan (IB), *In Vitro Fertilization* (IVF), maupun *Intra Cytoplasmic Sperm Injection* (ICSI).

Untuk tujuan IB, spermatozoa epididimis dapat disimpan dalam bentuk semen cair maupun semen beku sebelum digunakan. Dalam bentuk semen cair, spermatozoa diencerkan terlebih dahulu menggunakan medium tertentu dengan komposisi yang sesuai dengan kondisi fisiologis dalam epididimis dan selanjutnya disimpan dalam suhu 4°C. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa Tris kuning telur merupakan medium pengencer terbaik untuk spermatozoa anjing (ROTA *et al.*, 1995; IGUER-OADA dan VERSTEGEN, 2001; SETIADI *et al.*, 2006). Selama penyimpanan pada suhu tersebut, metabolisme sel spermatozoa hanya dapat dikurangi, namun tidak dapat dihentikan sama sekali, sehingga tetap membutuhkan adanya sumber energi dan zat pelindung membran yang berasal dari pengencer.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penyimpanan pada suhu 4°C terhadap kualitas spermatozoa epididimis anjing, dalam hal ini motilitas progresif dan keutuhan membran plasma sehingga nantinya dapat diaplikasikan pada jenis karnivora lain baik hewan kesayangan maupun untuk menyelamatkan hewan yang terancam punah.

MATERI DAN METODE

Sebanyak tujuh ekor anjing jantan lokal dari bangsa yang sama dengan bobot hidup antara 8,5-19,5 kg dikastrasi untuk diambil testisnya. Spermatozoa dikoleksi dari cauda epididimis dengan teknik pembilasan/*flushing* menggunakan 15 ml larutan NaCl fisiologis (0,9% w/v). Cairan hasil *flushing* selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1100 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan endapan spermatozoa. Selanjutnya supernatan dibuang dan konsentrasi spermatozoa yang terkandung dalam endapan dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer. Parameter lain yang diamati adalah persentase motilitas progresif

(%M) dan persentase membran plasma utuh (%MPU). Spermatozoa epididimis selanjutnya diencerkan dalam medium Tris sitrat buffer dengan konsentrasi $30 \cdot 10^6$ spz/ml dan disimpan dalam kulkas bersuhu 4°C selama tiga hari.

Bahan pengencer yang digunakan terdiri dari 2,40 g Tris (*hydroxymethyl*) aminomethan (Sigma, USA), 1,30 g asam sitrat monohidrat (Merck, Germany), 1,00 g D(-) fruktosa (Sigma, USA), 100.000 IU penisilin-G (Meiji, Japan), 0,1 g streptomisin sulfat (Meiji, Japan), akuabidestilata 100 ml. Ke dalam bahan pengencer tersebut ditambahkan kuning telur sebanyak 20% yang mengandung lipoprotein dan lechitin sebagai pelindung membran spermatozoa terhadap efek *cold shock* (TSUTSUI *et al.*, 2003a).

Parameter yang diamati setiap hari adalah %M dan %MPU. Persentase motilitas progresif adalah pengamatan visual spermatozoa yang bergerak ke depan dan dihitung secara subjektif (DEN DAAS, 1992) dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran objektif 40 kali pada beberapa lapang pandangan yang berbeda. Penilaian yang diberikan dari angka 0-100%. Evaluasi terhadap keutuhan membran plasma spermatozoa (% MPU) dilakukan dengan menggunakan metode *hypoosmotic swelling test* (HOS Test). Medium hipoosmotik yang digunakan merujuk metode RODRIQUEZ-GIL *et al.* (1994), yakni dengan melarutkan 1,3 g fruktosa (Sigma, USA) dan 0,7 g Na Citrat (Sigma, USA) ke dalam 100 ml aquabidestilata. Selanjutnya sebanyak 0,1 ml semen dicampur dengan 9,9 ml medium hipoosmotik dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ bersuhu 37°C selama 45 menit. Spermatozoa dengan membran yang utuh akan terlihat bengkok pada bagian ekor, sedangkan jika membran plasma telah mengalami kerusakan ditandai dengan ekor spermatozoa yang lurus. Data dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA). Perbedaan antar perlakuan diuji dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi spermatozoa epididimis yang terkoleksi dengan teknik *flushing* pada penelitian ini sangat beragam yakni sebesar $95,29 \cdot 10^6$ spz/ml dengan interval $10-296 \cdot 10^6$ spz/ml (Tabel 1). Hasil ini berbeda dengan laporan HORI *et al.* (2004) sebesar $615 \cdot 10^6$ spz/ml dari epididimis anjing, YULNAWATI dan SETIADI (2005) sebesar 108,40 spz/ml dan TSUTSUI *et al.* (2003b) sebesar $58-64 \cdot 10^6$ spz/ml dari epididimis kucing, serta RIZAL *et al.* (2004) sebesar $2080-3460 \cdot 10^6$ spz/ml dari epididimis domba. Perbedaan ini diduga akibat perbedaan jenis hewan yang digunakan, umur dan nutrisi serta status kesehatan dari hewan tersebut. Disamping itu, perbedaan teknik koleksi spermatozoa juga akan mempengaruhi konsentrasi dan kualitas

spermatozoa *post thawing*. SIRIVAIIDYAPONG (2002) melaporkan bahwa teknik koleksi dengan melakukan pembilasan menggunakan medium yang mengandung serum, TCM-199 atau Tris buffer dan jarum yang dimasukkan ke dalam vas deferens dapat meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis anjing. Koleksi spermatozoa epididimis dapat dilakukan dengan berbagai teknik seperti pembilasan (*flushing*), aspirasi, pencacahan, maupun campuran bilas dan tekan (RIZAL *et al.*, 2004).

Sebagai indikator fertilitas, persentase spermatozoa yang motil progresif akan sangat menentukan keberhasilan kebuntingan dengan teknik reproduksi bantuan. Persentase motilitas progresif spermatozoa epididimis anjing hasil koleksi adalah sebesar 70,71%. Hasil ini hampir sama dengan hasil penelitian VEZNIK *et al.* (2003) menggunakan spermatozoa anjing asal ejakulat sebesar 74,04%. Hal tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa epididimis telah memiliki kemampuan motilitas yang mendekati spermatozoa ejakulat sehingga dapat digunakan untuk keperluan IB. Pematangan spermatozoa pada bagian cauda epididimis terjadi akibat hilangnya residu phosphotyrosine dari bagian kepala spermatozoa (LEWIS dan AITKEN, 2001) sehingga memiliki daya motilitas dan fertilitas yang setara dengan spermatozoa yang terdapat dalam ejakulat. Dilaporkan juga bahwa spermatozoa yang berasal dari cauda epididimis memiliki rataan penyerapan calcium yang tidak berbeda nyata dengan spermatozoa ejakulat. Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa epididimis telah memiliki kemampuan fertilitas yang setara dengan spermatozoa asal ejakulat (MERKIES dan BUHR, 1998).

Tabel 1. Kualitas spermatozoa epididimis anjing pada saat koleksi

Parameter	Hasil
Konsentrasi (10^6 spz/ml)	95,29 ± 91,22 (10-296)
Motilitas progresif (%)	70,71 ± 3,19
MPU (%)	72,85 ± 1,88

Keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis hasil koleksi adalah sebesar 72,85%. Hasil ini lebih rendah daripada hasil HOS *Test* pada spermatozoa asal ejakulat anjing sebesar 90,7% (VEZNIK *et al.*, 2003). Adanya cairan dari kelenjar asesoris yang membentuk plasma semen diduga sebagai penyebab perubahan kestabilan membran plasma spermatozoa ejakulat dengan spermatozoa epididimis.

Penurunan motilitas spermatozoa terjadi secara nyata ($P < 0,05$) selama penyimpanan pada suhu 4°C (Tabel 2). Hingga hari kedua penyimpanan persentase

motilitas spermatozoa masih mencapai 45,71% sehingga masih layak digunakan untuk IB. Syarat mutlak untuk IB adalah spermatozoa yang masih memiliki motilitas progresif sebesar 40% (HAFEZ dan HAFEZ, 2000) dan persentase MPU sebesar 60% (REVELL dan MRODE, 1994). Meskipun demikian, motilitas spermatozoa epididimis anjing pada hari ketiga penyimpanan masih dapat digunakan untuk tujuan aplikasi teknologi reproduksi bantuan lainnya seperti IVF dan ICSI.

Tabel 2. Persentase motilitas dan membran plasma utuh spermatozoa epididimis anjing selama empat hari penyimpanan pada suhu 4°C

Waktu penyimpanan	Parameter	
	Motilitas (%)	MPU (%)
H-0	70,71 ± 3,19 ^a	72,85 ± 1,88 ^a
H-1	60,71 ± 1,75 ^b	68,88 ± 1,48 ^b
H-2	45,71 ± 4,16 ^c	61,06 ± 1,91 ^c
H-3	33,57 ± 7,89 ^d	47,47 ± 11,09 ^d

Huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)

Persentase motilitas progresif spermatozoa anjing sangat dipengaruhi oleh tekanan osmotik medium (SONGASEN *et al.*, 2002). Selama penyimpanan pada suhu 4°C, metabolisme spermatozoa tetap berlangsung secara terbatas, sehingga akan mempengaruhi tekanan osmotik medium. Hal tersebut diduga menjadi penyebab utama penurunan persentase motilitas progresif spermatozoa epididimis anjing selama penyimpanan pada suhu 4°C.

Persentase MPU juga menunjukkan adanya perbedaan nyata pada setiap hari penyimpanan ($P < 0,05$). Pada hari kedua penyimpanan, persentase MPU sebesar 61,06% dan masih memenuhi syarat untuk IB. Penurunan persentase MPU terjadi akibat kerusakan membran plasma spermatozoa karena pengerasan lapisan phospholipid akibat suhu yang rendah (SANKAI *et al.*, 2001). Kuning telur yang mengandung lechitin dan lipoprotein dalam bahan pengencer dapat melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan akibat cekaman dingin dan menghindarkan terjadinya reaksi akrosom dini selama penyimpanan (IGUER-OADA dan VERSTEGEN, 2001).

Motilitas spermatozoa berkorelasi erat dengan keutuhan membran plasma (YU dan LEIBO 2002). Kerusakan pada membran plasma merupakan awal dari terganggunya metabolisme sel dan spermatozoa akan

kehilangan motilitas sehingga akan berujung pada kematian sel.

Penyimpanan spermatozoa pada suhu 4°C hanya dapat menekan aktivitas metabolisme spermatozoa. Akibatnya spermatozoa masih dapat melakukan aktivitas metabolisme secara terbatas selama penyimpanan. Adanya aktivitas metabolisme ini mengakibatkan terbentuknya zat hasil metabolik dan radikal bebas yang bersifat toksik terhadap spermatozoa. Zat sisa metabolit ini juga akan mempengaruhi osmolaritas medium penyimpanan sehingga secara umum akan mempengaruhi motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa. Perbedaan osmolaritas medium sangat berpengaruh terhadap metabolisme spermatozoa selama penyimpanan (IGUER-OADA dan VERSTEGEN *et. al.*, 2001).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa penyimpanan spermatozoa epididimis anjing pada suhu 4°C menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Penurunan kualitas tersebut terjadi akibat perubahan tekanan osmotik medium selama penyimpanan yang sangat berpengaruh terhadap motilitas progresif dan keutuhan membran plasma. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui kemampuan pembuahan spermatozoa epididimis anjing setelah penyimpanan pada suhu 4°C dengan aplikasi teknologi reproduksi bantuan seperti IB, IVF maupun ICSI.

DAFTAR PUSTAKA

- AXNER, E. 2004. Sperm collection and preservation in carnivores. *Proceeding Reproductive Technique in Conservation Biology*, Uppsala March 18, 2004. pp 12.
- DEN DAAS, N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 87-94.
- HAFEZ, E.S.E. and B. HAFEZ. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th Edition. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkins.
- HEROLD, F.C., J.E. AURICH and D. GERBER. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed[®] and with Triladyl[™] but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61: 715-724.
- HORI, T., M. ICHIKAWA, E. KAWAKAMI and T. TSUTSUI. 2004. Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 37-41.
- IGUER-OADA, M. and J.P. VERSTEGEN. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671-684.
- KIKUCHI, K., T. NAGAI, N. KASHIWAZAKI, H. IKEDA, J. NOGUCHI, A. SHIMADA, E. SOLOY and H. KANEKO. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50: 615-623.
- LEWIS, B. and R.J. AITKEN. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 64: 1545-1556.
- MERKIES, K. and M.M. BUHR. 1998. Epididymal maturation affects calcium regulation in equine spermatozoa exposed to heparin and glucose. *Theriogenology* 49: 683-695.
- RIZAL, M., HERDIS dan A. BOEDIONO. 2004. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5°C). *J. Anim. Prod.* 6: 30-36.
- REVELL, S.G. and R.A. MRODE. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E., A. MONTERRAT and T. RIGAU. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42: 815-830.
- ROTA, A., B. STROM and C. LINDE-FORSBERG. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored 4°C. *Theriogenology* 44: 885-900.
- SANKAI, T., H. TSUCHIYA and N. OGONUKI. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55: 1759-1768.
- SETIADI, M.A., A. SUPRAYOGI and YULNAWATI. 2006. Viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa epididimis anjing selama penyimpanan pada pengencer yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan* 22: 118-123.
- SILVA, A.R., R.G. MORATO and L.D.M. SILVA. 2004. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim. Reprod. Sci.* 81: 159-175.
- SIRIVAIYAPONG, S. 2002. Motility and viability of canine epididymal sperm collected by different methods. *Proceeding of the third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals*. Liege, Belgium. pp 170.
- SONGASEN, N., I. YU, S. MURTON, D.L. PACCAMONTI, B.E. EILTS, R.A. GODKE and S.P. LEIBO. 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology* 44: 79-90.
- TSUTSUI, T., M. WADA, M. ANZAI and T. HORI. 2003a. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 397-399.
- TSUTSUI, T., T. TEZUKA, Y. MIKASA, H. SUGISAWA, N. KIRIHARA, T. HORI and E. KAWAKAMI. 2003b. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 307-312.
- VEZNIK, Z., D. SVECOVA, ZAJICOVA and P. PRINOSILOVA. 2003. Functional evaluation of dog ejaculates with priority given to the aspect of acrosome integrity. *Vet. Med. Czech.* 48: 221-228.

YU, I. and S.P. LEIBO. 2002. Recovery motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57: 1179-1190.

YULNAWATI dan M.A. SETIADI. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *J. Med. Vet.* 21: 100-104.