

SPERMATOZOA DARI KAUDA EPIDIDIMIS: KRIOPRESERVASI DAN PEMANFAATAN UNTUK INSEMINASI BUATAN DAN FERTILISASI *IN VITRO*

FITRA AJI PAMUNGKAS

*Loka Penelitian Kambing Potong
Sei Putih, PO Box 1, Galang 20585 Sumatera Utara
fitrap@yahoo.com*

(Makalah masuk 19 Juli 2012 – Diterima 22 Oktober 2012)

ABSTRAK

Materi genetik dari hewan baik untuk tujuan ekonomi maupun penangkaran hewan liar dapat hilang kapan saja oleh kematian hewan secara tak terduga, libido yang rendah maupun gangguan reproduksi. Upaya yang dapat dilakukan dalam penyelamatan materi genetik dari hewan jantan yang sudah mati yaitu dengan pemanfaatan spermatozoa epididimis. Spermatozoa kauda epididimis umumnya *motil*, *mature* dan dapat menembus oosit seperti halnya spermatozoa yang berasal dari ejakulat. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa kriopreservasi dan penggunaan spermatozoa kauda epididimis untuk tujuan inseminasi buatan dan fertilisasi *in vitro* masih menunjukkan kemampuan untuk memfertilisasi oosit serta dapat menghasilkan anak.

Kata kunci: Spermatozoa, kauda epididimis, inseminasi buatan, fertilisasi *in vitro*

ABSTRACT

CAUDA EPIDIDYMIS SPERMATOZOA: CRYOPRESERVATION AND UTILIZATION FOR ARTIFICIAL INSEMINATION AND *IN VITRO* FERTILIZATION

Genetic material either from animals of economical interest or from wildlife conservation can be lost anytime by unexpected death of the animal, low libido, or disorder at reproduction. In this case, the total lost of that genetic material can be avoided by utilization of epididymis spermatozoa. Cauda epididymis spermatozoa generally motile, mature and as ejaculated spermatozoa, that able to fertilize oocytes. Some research indicated that cryopreservation and utilization of cauda epididymis spermatozoa for the purpose of artificial insemination and *in vitro* fertilization showed the ability to fertilize oocytes and produce offspring.

Key words: Spermatozoa, cauda epididymis, artificial insemination, *in vitro* fertilization

PENDAHULUAN

Materi genetik hewan yang mempunyai nilai ekonomis, terancam punah atau populasinya yang semakin sedikit maupun satwa liar bisa hilang kapan saja oleh kematian hewan secara tak terduga, maupun libido yang rendah dan gangguan reproduksi (DROUINEAUD *et al.*, 2003; KAABI *et al.*, 2003). Upaya yang dapat dilakukan untuk menghindari hilangnya materi genetik hewan secara keseluruhan adalah dengan cara menyelamatkan materi genetik tersebut untuk dapat digunakan kembali melalui aplikasi teknologi. Penyelamatan materi genetik dalam rangka pelestarian plasma nutfah dari hewan yang sudah mati dapat dilakukan dengan bantuan teknik reproduksi yang telah banyak berkembang, diantaranya pada hewan jantan dengan pemanfaatan spermatozoa yang berasal dari epididimis (HORI *et al.*, 2005; NAZLIE, 2004).

Posisi dimana spermatozoa akan diambil untuk dikoleksi berkaitan erat dengan kemampuan fertilisasi. Spermatozoa yang berada pada testis atau kaput epididimis pada hewan yang sudah mati adalah *immotile* dan *immature*, sedangkan spermatozoa yang mencapai kauda epididimis umumnya *motil* dan *mature* serta mempunyai kemampuan fertilisasi (TOSHIMORI, 2003). WILLIAMS *et al.* (1991) juga melaporkan pada domba jantan, spermatozoa yang dikoleksi dari korpus atau kaput epididimidis tidak dapat menembus oosit pada saat fertilisasi *in vitro*, sementara yang berasal dari kauda epididimis dapat menembus oosit seperti halnya spermatozoa yang berasal dari ejakulat dan masih menunjukkan kemampuan untuk membuahi oosit secara *in vitro* serta dapat menghasilkan keturunan (JISHAGE *et al.*, 1997; SONGSASEN *et al.*, 1998).

Spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis memiliki motilitas, integritas membran plasma dan

morfologi yang tidak berbeda dengan spermatozoa dari ejakulat baik sebelum atau setelah kriopreservasi (TEBET *et al.*, 2006; HERMANSSON dan AXNER, 2007). Spermatozoa yang berasal dari bagian kauda epididimis memiliki kemampuan membuahi oosit yang sama baiknya dengan spermatozoa dari ejakulat (HAFEZ dan HAFEZ, 2000). Hal ini karena spermatozoa yang terdapat di bagian kauda telah melewati proses pematangan di bagian kaput dan korpus epididimis, serta sudah memiliki kemampuan bergerak (motil) yang sama dengan spermatozoa dari ejakulat (AXNER *et al.*, 1998).

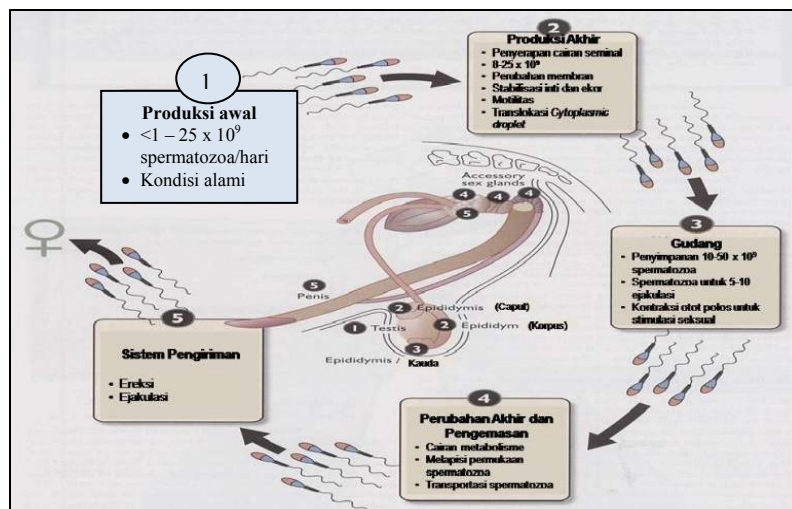
Pada sebagian besar spesies, spermatozoa tetap dapat bertahan hidup di kauda epididimis untuk paling tidak dua sampai tiga minggu (SETCHELL *et al.*, 1993). Lebih lanjut dinyatakan bahwa spermatozoa dari kauda epididimis tetap hidup dengan kualitas yang masih baik untuk jangka waktu antara 10 – 20 jam *postmortem* (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2005). Kondisi ini menjadi pertanyaan besar mengenai kemungkinan spermatozoa asal kauda epididimis dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama pada kondisi buatan dan penggunaannya untuk tujuan inseminasi buatan (IB) dan fertilisasi *in vitro* (FIV).

PERBEDAAN SPERMATOOZOA DARI KAUDA EPIDIDIMIS DAN EJAKULAT

Proses fisiologis pembentukan spermatozoa sampai dengan diejakulasikan menjadi faktor utama yang perlu dipahami dalam rangka memperoleh metode terbaik di dalam pemanfaatan spermatozoa dari kauda epididimis (Gambar 1). Pematangan membran

spermatozoa ketika melalui epididimis berkaitan erat dengan terjadinya modifikasi pada permukaan spermatozoa yang diakibatkan kandungan karbohidrat serta penyerapan makromolekul yang dihasilkan oleh epididimis (KIRCHHOFF dan SCHROTER, 2001). Pematangan spermatozoa di epididimis sangat mempengaruhi komposisi membran *lipid* yaitu konsentrasi plasmalogen fosfolipid meningkat 40%, kandungan asam lemak tak jenuh menjadi lebih tinggi dan konsentrasi kolesterol yang relatif lebih rendah. Efek fisiologis dari akuisisi makromolekul di epididimis tersebut kemungkinan berkaitan dengan perkembangan motilitas dan fertilisasi dari spermatozoa (JONES, 1998).

Meskipun potensi reproduksi spermatozoa dari kauda epididimis sudah jelas, namun spermatozoa dari kauda epididimis memiliki beberapa karakteristik yang membuatnya tampak berbeda dengan spermatozoa dari ejakulat yaitu *cytoplasmic droplet* di sepanjang bagian tengah spermatozoa. *Cytoplasmic droplet* merupakan sisa dari sitoplasma pada saat sel spermatozoa matang menjadi spermatid dan bertemu dengan cairan seminal. Selain perbedaan fisik, terdapat pula perbedaan metabolisme dimana respirasi spermatozoa dari epididimis lebih lambat dibandingkan spermatozoa dari ejakulat dan lebih efisien dalam pemanfaatan energi yang dipakai (COOPER, 2005). Pada rusa, meskipun motilitas spermatozoa dari kauda epididimis setelah pencairan kembali (*post-thawing*) tidak berbeda dengan spermatozoa dari ejakulat, penggunaan gliserol dalam bahan pengencer sebesar 8% dapat melindungi akrosom lebih baik pada saat *post-thawing* (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2006).



Gambar 1. Sistem produksi spermatozoa pada saluran reproduksi jantan

Sumber: SENGGER (2005)

Disamping itu, spermatozoa dari epididimis dan ejakulat memiliki perbedaan baik secara biokimia maupun fungsional dalam hal tingkat respirasi (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990), jumlah *heparin binding site* (NASS *et al.*, 1990), kemampuan kapasitas dan morfologi (HEWITT *et al.*, 2001), jenis protein yang mengikat membran plasma dan karakteristik gerakan yang berbeda (GOOAVERTS *et al.*, 2006). Spermatozoa dari kauda epididimis dan ejakulat telah dilaporkan merespon kafein secara berbeda bila digunakan sebagai stimulan motilitas spermatozoa. Ketika spermatozoa dari kauda epididimis diinkubasi dalam medium yang mengandung kafein akan terjadi peningkatan motilitas spermatozoa, berbeda halnya pada spermatozoa dari ejakulat. Hal ini karena pada spermatozoa dari kauda epididimis belum terkena sekresi plasma semen dan peranan kafein dalam menghambat enzim *nukleotida phosphodiesterase* lebih efisien sehingga meningkatkan rantai *adenosine monophosphate* (AMP) yang ada di dalam spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis (WESTON *et al.*, 2005).

Spermatozoa secara fungsional matang dalam kauda epididimis akan tetapi kehadiran plasma semen pada saat ejakulasi dapat memodifikasi fungsi spermatozoa sehingga mengubah sifat dan respon dari membran spermatozoa (WHITE, 1993). Komponen plasma semen berupa enzim, hormon, protein, maupun metabolit yang berkontribusi terhadap kompetisi spermatozoa melewati barrier, menyediakan nutrisi bagi spermatozoa, merangsang kapasitas dengan memfasilitasi kolesterol *efflux* dari membran plasma, membantu pengaturan reaksi akrosom, mendukung fertilisasi dengan mempertahankan pH, serta memainkan peranan dalam motilitas spermatozoa dan kontraksi saluran reproduksi betina (POIANI, 2006). Berbeda halnya dengan yang dilaporkan BERGERON *et al.* (2005) bahwa plasma semen mengandung faktor dekapasitasi (*spermadhesins*) yang terdiri dari struktur biokimia diantaranya peptida dengan berat molekul yang rendah, glikoprotein, steroid dan kolesterol yang reversibel dalam mengikat spermatozoa dan menghambat kapasitas.

Keterbatasan penggunaan spermatozoa dari kauda epididimis

Pemanfaatan spermatozoa dari kauda epididimis setelah kematian hewan memiliki keterbatasan dalam metode koleksi dan teknik kriopreservasi. Ada tiga metode utama yang digunakan untuk mengoleksi spermatozoa dari kauda epididimis setelah epididimis dan *vas deferens* dipisahkan dari testis.

Metode pertama adalah *mincing* (pencincangan), dimana kauda epididimis diletakkan pada medium koleksi dan setelah *mincing*, spermatozoa akan bergerak menjauhi jaringan lalu dikoleksi dengan pipet

(HEWITT *et al.*, 2001). Metode ini sering digunakan dalam spesies yang berukuran kecil dimana kauda epididimis sulit dimanipulasi karena ukurannya yang kecil (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2005). Metode kedua adalah *slicing* (pengirisan) atau penusukan. Bagian kauda epididimis dipotong dengan pisau bedah atau ditusuk dengan jarum pada beberapa tempat, ditempatkan pada medium koleksi lalu ditekan hingga spermatozoa keluar dan bergerak menjauhi jaringan epididimis untuk kemudian dikoleksi dengan pipet. Kelemahan dari metode *mincing* dan *slicing* adalah spermatozoa yang terkoleksi harus disentrifugasi dengan tujuan menghilangkan sel-sel darah dan jaringan agar sampel tidak tercemar (HARSHAN *et al.*, 2005) sehingga menyebabkan kerusakan struktur pada akrosom, mengurangi motilitas dan menyebabkan penurunan aktivitas enzimatis dari spermatozoa sehingga menurunkan tingkat fertilisasi (ALVAREZ *et al.*, 1993). Metode ketiga adalah *flushing* (pembilasan) dimana spermatozoa dari epididimis dikeluarkan seperti transportasi yang normal dengan memasukkan medium atau udara selang/jarum suntik berukuran kecil melalui *vas deferens* sehingga mendorong spermatozoa keluar melalui sayatan kecil yang dibuat pada posisi distal dari epididimis. Keuntungan dari metode ini adalah mengurangi kontaminasi sehingga meningkatkan kualitas spermatozoa (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2005).

KRIOPRESERVASI SPERMATOZOA DARI KAUDA EPIDIDIMIS

Meskipun penggunaan spermatozoa dari kauda epididimis dalam bentuk segar merupakan prosedur alternatif, kriopreservasi spermatozoa merupakan metode yang dapat digunakan untuk konservasi materi genetik ternak secara lebih efisien dan ekonomis karena bisa dimanfaatkan kapan saja tidak hanya setelah kematian hewan dan agar bisa disimpan untuk jangka waktu yang tidak terbatas di bank spermatozoa sebagai cadangan keragaman materi genetik hewan (EHLING *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007; ROLDAN dan GOMENDIO, 2009).

Kriopreservasi spermatozoa dari kauda epididimis telah dilakukan pada berbagai spesies termasuk babi (RATH dan NIEMANN, 1997), anjing (STILLEY *et al.*, 1999), kambing (BLASH *et al.*, 2000), domba (SURACHMAN *et al.*, 2006; PAMUNGKAS, 2012), tikus (KOSHIMOTO *et al.*, 2000), kerbau (YULNAWATI *et al.*, 2008), manusia (PATRIZIO, 2000) dan kuda (TIPLADY *et al.*, 2002), dengan hasil yang bervariasi (Tabel 1).

Secara umum kualitas spermatozoa asal kauda epididimis pada semua ternak yang telah dibekukan lebih rendah dibandingkan dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Seiring dengan proses pematangan spermatozoa di dalam epididimis, terjadi perubahan

Tabel 1. Perbandingan karakteristik spermatozoa dari ejakulat dan epididimis pada berbagai spesies ternak

Ternak	Spermatozoa	Metode koleksi	Segar				Post-thawing				Pustaka
			PM	VIA	IM	AB	PM	VIA	IM	AB	
			----- % -----								
Rusa	ejakulat	elektro ejakulator	-	-	-	-	52,63	38,25	26,38	-	MARTINEZ-PASTOR <i>et al.</i> (2006)
	epididimis	<i>Slicing</i>	-	-	-	-	48,25	55,30	55,91	-	
Kuda	ejakulat	vagina buatan	43,30	-	-	-	33,00	-	35,90	-	MONTEIRO <i>et al.</i> (2011)
	epididimis	<i>Slicing</i>	9,80	-	-	-	36,20	-	41,40	-	
Keledai	ejakulat	vagina buatan	76,00	71,70	-	7,81	-	-	-	-	GLORIA <i>et al.</i> (2011)
	epididimis	<i>Slicing</i>	70,00	90,90	-	15,49	-	-	-	-	
Kucing	ejakulat	elektro ejakulator	67,50	-	60,40	-	-	-	-	-	HERMANSSON dan AXNER (2007)
	epididimis	<i>Mincing</i>	52,50	-	59,70	-	-	-	-	-	
Kucing	ejakulat	elektro ejakulator	82,00	-	72,80	14,90	62,50	-	50,80	35,60	TEBET <i>et al.</i> (2006)
	epididimis	<i>Slicing</i>	77,50	-	71,70	16,30	59,00	-	53,00	32,00	
Kerbau	ejakulat	vagina buatan	70,00	-	77,50	6,50	41,67	-	47,33	-	YULNAWATI <i>et al.</i> (2010)
	epididimis	<i>Slicing</i>	65,00	-	79,00	15,00	41,67	-	67,33	-	
Domba	ejakulat	vagina buatan	76,67	82,89	83,55	-	52,78	58,78	56,22	-	RIZAL (2006)
	epididimis	<i>Slicing</i>	70,83	82,83	81,33	-	45,00	54,50	48,83	-	
Domba	ejakulat	vagina buatan	59,10	62,00	-	-	59,10	29,30	-	-	ALVAREZ <i>et al.</i> (2012)
	ejakulat	elektro ejakulator	48,70	64,60	-	-	46,60	25,50	-	-	
Domba	epididimis	<i>Slicing</i>	62,00	71,90	-	-	57,60	35,70	-	-	PAMUNGKAS (2012)
	ejakulat	vagina buatan	78,00	91,19	84,07	1,77	54,00	69,60	65,54	2,65	
Sapi	epididimis	<i>Slicing</i>	74,00	94,05	88,06	1,62	48,00	68,18	75,38	2,80	ALAPATI <i>et al.</i> (2009)
	ejakulat	vagina buatan	64,40	-	-	-	36,30	-	-	-	
	epididimis	<i>Flushing</i>	71,30	-	-	-	46,30	-	-	-	

PM: Motilitas; VIA: Viabilitas; IM: Integritas membran; AB: Abnormalitas

- = tidak ada data

komposisi senyawa penyusun membran plasma sel. Sebagian kolesterol yang terdapat pada membran plasma sel diserap, sehingga nisbah antara asam lemak tak jenuh dan kolesterol meningkat. Hal ini menyebabkan membran plasma sel menjadi kurang stabil, karena permeabilitas meningkat. Untuk mencegah terjadinya reaksi akrosom prematur, membran plasma sel spermatozoa diproteksi oleh senyawa-senyawa inhibitor berupa glikoprotein yang disintesis oleh kelenjar vesikularis (NOLAN dan HAMMERSTEDT, 1997).

Rendahnya kualitas spermatozoa asal kauda epididimis setelah kriopreservasi diduga karena tidak seperti pada spermatozoa hasil ejakulasi, membran plasma spermatozoa asal kauda epididimis tidak mendapatkan perlindungan berupa glikoprotein yang disintesis oleh kelenjar vesikularis hewan jantan yang disekresikan ke dalam plasma semen. Glikoprotein ini sangat penting dalam melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan akibat pengaruh kejutan

dingin pada saat koleksi spermatozoa dan selama proses kriopreservasi spermatozoa. Hal ini menyebabkan menurunnya daya hidup spermatozoa asal kauda epididimis serta meningkatnya persentase reaksi akrosom yang prematur akibat rusaknya membran plasma sel (TOYONAGA *et al.*, 2011).

PEMANFAATAN SPERMATOZOA DARI KAUDA EPIDIDIMIS

Penerapan teknologi Inseminasi Buatan (IB) pada ternak umumnya menggunakan spermatozoa hasil koleksi dalam bentuk semen cair dan semen beku yang berasal dari spermatozoa hasil ejakulasi. Namun pemanfaatan spermatozoa berasal dari kauda epididimis untuk menghasilkan kebuntingan sampai dengan kelahiran anak telah dibuktikan oleh beberapa peneliti pada berbagai jenis ternak melalui teknologi IB seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pemanfaatan spermatozoa dari kauda epididimis dalam aplikasi teknologi reproduksi

Jenis ternak	Spermatozoa segar/beku	Penyimpanan	Thawing	Metode fertilisasi	Hasil fertilisasi (%)	Pustaka
Kambing	Beku	-196°C	37°C, 2 menit	FIV	40,0	BLASH <i>et al.</i> (2000)
				IBs	5,0	
Domba	Beku	-196°C	37°C, 17 detik	IBI	87,5	EHLING <i>et al.</i> (2006)
	Beku	-196°C	37°C, 30 detik	IBs	33,33	RIZAL (2006)
Babi	Beku	-196°C	37°C, 3 menit	FIV	40,0	KIKUCHI <i>et al.</i> (1998)
Kucing	Beku	-196°C	37 °C, 30 detik	IBI	27,3	TSUTSUI <i>et al.</i> (2003)
Anjing	Beku	-196°C	37°C, 45 detik	IBI	20,0	HORI <i>et al.</i> (2005)
Mencit	Beku	-196°C	37°C, 10 detik	FIV	28,5	SONGSASEN <i>et al.</i> (1997)
	Segar	22°C, 0 jam	-	FIV	81,0	SONGSASEN <i>et al.</i> (1998)
	Segar	4 – 6°C	-	FIV	28,0	AN <i>et al.</i> (1999)
	Segar	4°C, 0 hari		FIV	81,5	KISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
		4°C, 15 hari		FIV	2,7	
Kuda	Beku	-196°C	37°C, 30 detik	IBs	50,0	MORRIS <i>et al.</i> (2002)
	Beku	-196°C	46°C, 20 detik	IBI	66,6	PAPA <i>et al.</i> (2008)
	Beku	-196°C	46°C, 20 detik	IBI	92,3	MONTEIRO <i>et al.</i> (2011)
Tikus	Beku	-196°C	37°C, 10 detik	IBI	69,2	NAKATSUKASA <i>et al.</i> (2001)
	Segar	4°C, 0 jam	-	FIV	95,0	JISHAGE <i>et al.</i> (1997)
		4°C, 120 jam	-	FIV	3,0	
Rusa	Beku	-196°C	37°C, 20 detik	IBI	69,7	SOLER <i>et al.</i> (2003)
Sapi	Beku	-196°C	35°C, 30 detik	FIV	82,1	MARTINS <i>et al.</i> (2007)

FIV: Fertilisasi *in vitro*; IBs: Inseminasi Buatan pada servik; IBI: Inseminasi Buatan pada intra uterine

- = tidak ada data

Tingkat fertilitas dari pemanfaatan spermatozoa kauda epididimis melalui teknologi IB tergantung spermatozoa yang digunakan baik dalam bentuk segar atau dibekukan dan metode fertilisasi. Penggunaan metode *intrauterine* (deposisi semen pada tanduk uterus) dengan bantuan laparoskopi akan lebih memudahkan spermatozoa mencapai tempat fertilisasi, sehingga lebih banyak spermatozoa yang mencapai tempat fertilisasi dibandingkan dengan metode IB secara *intracervical* (deposisi semen pada daerah serviks). Hal ini dikarenakan pada metode *intracervical*, spermatozoa akan mengalami seleksi yang sangat ketat di dalam lumen serviks sehingga hanya sedikit spermatozoa yang dapat mencapai tempat fertilisasi. Persentase kebuntingan dan kelahiran yang dihasilkan melalui teknologi IB menggunakan spermatozoa dari kauda epididimis pada berbagai jenis ternak menunjukkan bahwa spermatozoa dari kauda epididimis layak digunakan dalam program IB.

Selain pemanfaatan spermatozoa dari kauda epididimis melalui teknologi IB, pemanfaatannya melalui teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV) juga telah banyak dilaporkan dan menghasilkan keturunan pada beberapa spesies seperti terlihat pada Tabel 2. Kemampuan membuahi oosit secara *in vitro* oleh spermatozoa setelah *thawing* dari kauda epididimis karena spermatozoa dari kauda epididimis dan ejakulat memiliki kesamaan dalam kemampuan mengikat protein pada zona pelusida dan menjaga kondisi kromatin dari spermatozoa tetap stabil yang didukung oleh defosforilasi *protamine* selama spermatozoa berada di epididimis (ALVAREZ *et al.*, 2009). Walaupun plasma semen dari spermatozoa ejakulat diikutsertakan selama proses kriopreservasi, namun pada saat proses FIV keberadaan plasma semen dihilangkan melalui sentrifugasi sehingga kondisinya sama dengan spermatozoa dari kauda epididimis. Spermatozoa yang disentrifugasi terlebih dahulu sebelum diinkubasi dalam medium FIV bertujuan untuk memisahkan suspensi dan pellet spermatozoa dimana spermatozoa dengan kualitas baik berada pada endapan atau pellet yang dihasilkan (OLLERO *et al.*, 2001). Selain itu, spermatozoa yang dikumpulkan dari pellet hasil sentrifugasi menunjukkan kerusakan DNA yang rendah (LARSON *et al.*, 1999), menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) yang lebih sedikit dan menghilangkan senyawa antioksidan yang terdapat pada plasma semen (OLLERO *et al.*, 2001). HARKEMA *et al.* (1998) melaporkan bahwa keberadaan plasma semen pada spermatozoa dari ejakulat yang dihilangkan sebelum diinkubasi dalam medium FIV dapat meningkatkan persentase spermatozoa dalam mengikat protein zona pelusida pada membran plasma, sama seperti halnya pada spermatozoa dari kauda epididimis.

KESIMPULAN

Penyelamatan materi genetik dalam rangka pelestarian plasma nutfah dari hewan jantan yang sudah mati dapat dilakukan melalui pemanfaatan spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis untuk dapat digunakan kembali melalui aplikasi teknologi reproduksi. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan spermatozoa dari kauda epididimis untuk tujuan IB dan FIV masih menunjukkan kemampuan untuk membuahi oosit serta dapat menghasilkan anak.

DAFTAR PUSTAKA

- ALAPATI, R., M. STOUT, J. SAENZ, G.T. GENTRY, R.A. GODKE and R.V. DEVIREDDY. 2009. Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. *Cryobiology* 59:164 – 170.
- ALVAREZ, J.G., J.L. LASSO, L. BLASCO, R.C. NUNEZ, S. HEYNER, P.P. CABALLERO and B.T. STOREY. 1993. Centrifugation of human spermatozoa induces sub lethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum. Reprod.* 8:1087 – 1092.
- ALVAREZ, O.G., A.M. MORALES, F. MARTINEZ-PASTOR, J.J. GARDE, M. RAMON, M.R.F. SANTOS, M.C. ESTESO, M.D.P. GUZMAN and A.J. SOLER. 2009. Sperm characteristics and *in vitro* fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Machega ram: Electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology* 72:160 – 168.
- ALVAREZ, L., L. DAI, B.M. FRIEDRICH, N.D. KASHIKAR, I. GREGOR, R. PASCAL and U.B. KAUPP. 2012. The rate of change in Ca^{2+} concentration controls sperm chemotaxis. *J. Cell. Biol.* 196: 548.
- AN, T.Z., S. WADA, K. EDASHIGE, T. SAKURAI and M. KASAI. 1999. Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38: 27 – 34.
- AXNER, E., H.B. STROM and F.C. LINDE. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50:973 – 979.
- BERGERON, A, M. VILLEMURE, C. LAZURE and P. MANJUNATH. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Develop.* 71:461 – 470.
- BLASH, S., D. MELICAN and W. GAVIN. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54:899 – 905.
- COOPER, T.G. 2005. Cytoplasmic droplets: The good, the bad or just confusing. *Hum. Reprod.* 20: 9 – 11.

- DROUINEAUD, V., P. SAGOT, L. FAIVRE, F. MICHEL and C. JIMENEZ. 2003. Birth after intracytoplasmic injection of epididymal sperm from a man with congenital bilateral absence of the vas deferens who had a robertsonian translocation. *Fertil. Steril.* 79(Suppl 3): 1649 – 1651.
- EHLING, C., D. RATH, C. STRUCKMANN, A. FRENZEL, L. SCHINDLER and H. NIEMANN. 2006. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology* 66: 2160 – 2164.
- GLORIA, A., A. CONTRI, I.D. AMICIS, D. ROBBE and A. CARLUCCIO. 2011. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. *Anim. Reprod. Sci.* 128: 117 – 122.
- GOOVAERTS, I.G.F., G.G. HOFACK, A. VAN SOOM, J. DEWULF, M. NICH and A. DE KRUIF. 2006. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology* 66: 323 – 330.
- HAFEZ, E.S.E. and B. HAFEZ. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Baltimore USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- HAMMERSTEDT, R.H., J.K. GRAHAM and J.P. NOLAN. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73 – 88.
- HARKEMA, W., R.A.P. HARRISON, N.G.A. MILLER, E.K. TOPPER and H. WOELDERS. 1998. Enhanced binding of zona pellucid proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol. Reprod.* 58: 421 – 430.
- HARSHAN, H.M., L.P. SINGH, A. ARANGASAMY, M.R. ANSARI and S. KUMAR. 2005. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and *in vitro* fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 124 – 133.
- HERMANSSON, U. and E. AXNER. 2007. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology* 67: 1239 – 1248.
- HEWITT, D.A., R. LEAHY, I.M. SHELDON and G.C. ENGLAND. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 101 – 111.
- HORI, T., M. ICHIKAWA, E. KAWAKAMI and T. TSUTSUI. 2005. Artificial insemination with frozen epididymal sperm beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 37 – 41.
- JISHAGE, K., O. UEDA and H. SUZUKI. 1997. Fertility of mouse spermatozoa from cauda epididymis preserved in paraffin oil at 4°C. *J. Mamm. Ova Res.* 14: 45 – 58.
- JONES, R. 1998. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.* 53): 73 – 84.
- KAABI, M., P. PAZ, M. ALVAREZ, E. ANEL, J.C. BOIXO, H. ROUISSI, P. HERRAEZ and L. ANEL. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered postmortem. *Theriogenology* 60: 1249 – 1259.
- 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.
- KIRCHHOFF, C. and S. SCHROTER. 2001. New insights into the origin, structure and role of CD52: A major component of the mammalian sperm glycocalyx. *Cells Tissues Organs* 168: 93 – 104.
- KISHIKAWA, H., H. TATENO and R. YANAGIMACHI. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *J. Reprod. Fertil.* 116: 217 – 222.
- KOSHIMOTO, C., E. GAMLIEL and P. MAZUR. 2000. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology* 41: 204 – 231.
- LARSON, K.L., J.D. BRANNIAN, B.K. TIMM, L.K. JOST and D.P. EVENSON. 1999. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum. Reprod.* 14: 2015 – 2019.
- MARTINEZ-PASTOR, F., C. GUERRA, M. KAABI, A.R. DIAZ, E. ANEL, P. HERRAEZ, P. DE PAZ and L. ANEL. 2005. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 63: 24 – 40.
- MARTINEZ-PASTOR, F., F. MARTINEZ, V.G. MACIAS, M.C. ESTESO, E. ANEL, R. M.R.F. SANTOS, A.J. SOLER, P. DE PAZ, J. GARDE and L. ANEL. 2006. A pilot study on post thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 66: 1165 – 72.
- MARTINS, C.F., R. RUMPF, D.C. PEREIRA and M.N. DODE. 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 326 – 331.
- MONTEIRO, G.A., F.O. PAPA, F.S. ZAHN, J.A. DELLAQUA, C.M. MELO, R.R.D. MAZIERO, B.R. AVANZI, M.A. ALVARENGA and P.N. GUASTI. 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127: 197 – 201.
- MORRIS, L., C. TIPLADY and W.R. ALLEN. 2002. The *in vivo* fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58: 643 – 646.

- NAKATSUKASA, E., T. INOMATA, T. IKEDA, M. SHINO and N. KASHIWAZAKI. 2001. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C . *J. Reprod. Fertil.* 122: 463 – 467.
- NASS, S.J., D.J. MILLER, M.A. WINER and R.L. AX. 1990. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol. Reprod. Develop.* 25: 237 – 246.
- NAZLIE, C.S. 2004. Kajian Kualitas Spermatozoa Kucing Asal Epididimis dan Ductus Deferens Setelah Proses Preservasi Selama 7 Hari pada Suhu 4°C . Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 82 hlm.
- NOLAN, J.P. and R.H. HAMMERSTEDT. 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.* 11: 670 – 682.
- OLLERO, M., G.E. GILL, M.C. LOPEZ, R.K. SHARMA, A. AQARWAL, K. LARSON, D. EVENSON, A.J. THOMAS and J.G. ALVAREZ. 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.* 16: 1912 – 1921.
- PAMUNGKAS, F.A. 2012. Karakteristik dan Kemampuan Fertilisasi *In Vitro* Spermatozoa Domba yang Berasal dari Kauda Epididimis dan Ejakulat. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 63 hlm.
- PAPA, F.O., C.M. MELO, E.G. FIORATTI, J.A. DELL'AQUA, F.S. ZAHN and M.A. ALVARENGA. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107: 293 – 301.
- PATRIZIO, P. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 169: 11 – 14.
- POIANI, A. 2006. Complexity of seminal fluid: A review. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60: 289 – 310.
- RATH, D. and H. NIEMANN. 1997. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47: 785 – 793.
- RIZAL, M. 2006. Fertilitas semen beku hasil ejakulasi dan spermatozoa beku asal cauda epididimis domba Garut. *J. Sain. Vet.* 24: 49 – 57.
- ROLDAN, E.R.S. and M. GOMENDIO. 2009. Sperm and conservation. In: *Sperm Biology*. Birkhead, T.R., D. Hosken and S. Pitnick (Eds). Academic Press. pp. 539 – 564.
- SENGER, P.L. 2005. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2nd Revised Edition. Washington: Current Conceptions. Inc.
- SETCHELL, B.P. L.G. SANCHEZ-PARTIDA and A. CHAIRUSSYUHUR. 1993. Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: A review. *Reprod. Fertil. Develop.* 5: 601 – 612.
- SOLER, A.J., A.J. GARCIA, M.R.F. SSANTOS, M.C. ESTESO and J.J. GARDE. 2003. Effects of thawing procedure on postthawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C . *J. Androl.* 24: 746 – 756.
- SONGSASEN, N., K.J. BETTERIDGE and S.P. LEIBO. 1997. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized *in vitro* with cryopreserved spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56: 143 – 152.
- SONGSASEN, N., J. TONG and S.P. LEIBO. 1998. Birth of live mice derived by *in vitro* fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *J. Exp. Zool.* 280: 189 – 196.
- STILLEY, K., C.E. POPE, D. PACCAMONTI, S.P. LEIBO and R.A. GODKE. 1999. Comparison of fresh, refrigerated and frozen-thawed canine epididymal sperm. *Proc. Soc. Theriogenol.* Nashville, TN. p. 16 (Abstr.).
- SURACHMAN, M., HERDIS, M.A. SETIADI and M. RIZAL. 2006. Kriopreservasi spermatozoa epididimis domba menggunakan pengencer berbasis lesitin. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 31: 83 – 89.
- TEBET, J.M., M.I.M. MARTINS, V.H. CHIRINEA, F.F. SOUZA, D. CAMPAGNOL and M.D. LOPES. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 66: 1629 – 1632.
- TIPLADY, C.A., L.H.A. MORRIS and W.R. ALLEN. 2002. Stallion epididymal spermatozoa: Pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology* 58: 225 – 228.
- TOSHIMORI, K. 2003. Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. *Microsc. Res. Technol.* 61: 1 – 6.
- TOYONAGA, M., M. MORITA, T. HORI and T. TSUTSUI. 2011. Distribution of glycoproteins on feline testicular sperm, epididymal sperm and ejaculated sperm. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 827 – 829.
- TSUTSUI, T., M. WADA, M. ANZAI and T. HORI. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 397 – 399.
- WESTON, V.L., L. MCLEAY and L.H. MORRIS. 2005. The *in vitro* response of quine epididymal and ejaculated spermatozoa to caffeine. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 272 – 275.
- WHITE, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod. Fertil. Develop.* 6: 639 – 658.
- WILLIAMS, R.M., J.K. GRAHAM and R.H. HAMMERSTEDT. 1991. Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. *Biol. Reprod.* 44: 1080 – 1091.

YULNAWATI, HERDIS, H. MAHESHWARI dan M. RIZAL. 2008. Kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan raffinosa sebagai krioprotektan ekstraseluler. JITV 13: 30 – 34.

YULNAWATI, M. GUNAWAN, H. MAHESHWARI, M. RIZAL, HERDIS and A. BOEDIONO. 2010. Quality of epididymal and ejaculated sperms of spotted buffalo in dextrose supplemented extender. J. Hayati 17: 27 – 30.