

Daya Hidup Sperma Epididimis Domba Setelah Disimpan pada Suhu Rendah (5°C)

Viability of Rams Epididymal Sperm after Preservation in Low Temperature (5°C)

Muhammad Rizal¹, Herdis² dan Arief Boediono³

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Ambon

²Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Budidaya Pertanian, Jakarta

³Laboratorium Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Abstract

The purpose of this research was to evaluate the viability of ram epididymal sperm collected from fresh caudal epididymis (H-0) or after storage in low temperature (5°C, in refrigerator) for one (H-1), two (H-2), and three (H-3) days. Collected sperm were diluted in modified Tris extender and they were preserved in refrigerator up to four days. The viability of diluted sperm was evaluated daily base on motility and sperm live. Results indicated that mean sperm concentration after sperm diluted with 0.05 ml Tris extender of caudal epididymis was 2745 million/ml. Sperm motility and percentage of live for H-0 (71.25% and 82.83%) and H-1 (70.00% and 79.17%) were significantly higher ($P < 0.05$) than H-2 (61.25% and 69.83%) and H-3 (51.67% and 66.17%). Percentages of sperm motility and live of diluted sperm and preserved in refrigerator for H-0 were significantly higher ($P < 0.05$) than H-1, H-2, and H-3. These results showed that epididymal sperm collected from caudal epididymis up to three days of preservation (without further storage of the diluted sperm) could be used for artificial insemination or *in vitro* fertilization programs. Diluted sperm of H-0 and H-1 could be preserved in refrigerator for two days and H-2 for one day.

Key Words: Epididymal Sperm, Viability, Rams

Pendahuluan

Penerapan teknologi reproduksi khususnya inseminasi buatan (IB) dan fertilisasi *in vitro* (FIV) hingga saat ini masih populer dengan menggunakan sperma (semen cair dan beku) hasil ejakulat. Hal ini menyebabkan sumber sperma yang lain seperti epididimis dari ternak atau hewan yang telah dipotong tidak banyak mendapat perhatian, sehingga terbuang begitu saja. Padahal sperma yang berasal dari bagian cauda epididimis memiliki kemampuan membuahi yang sama baiknya dengan spermatozoa hasil ejakulat (Hafez dan Hafez, 2000). Hal ini disebabkan sperma yang ada di bagian cauda telah melewati proses pematangan dibagian caput dan badan epididimis serta sudah memiliki

kemampuan bergerak (motilitas) yang sama dengan sperma hasil ejakulat (Axner *et al.*, 1999). Proses pematangan ditandai oleh berpindahnya butiran sitoplasma dari bagian proksimal ke distal ekor atau hilang sama sekali dari tubuh sperma (Toelihere, 1993).

Upaya pengolahan (cair dan beku) sperma yang dikoleksi dari epididimis menjadi metode alternatif yang dapat diterapkan pada ternak atau hewan yang memiliki kualitas genetik yang unggul tetapi tidak dapat ditampung semennya karena berbagai alasan, seperti: tidak bersedia melayani vagina buatan, tidak respon terhadap elektroejakulator dan masase, pincang, atau sebab-sebab lain yang menyebabkan hewan tersebut tidak mau kawin. Metode ini juga akan sangat membantu dalam upaya menyelamatkan

plasma nutfah ternak atau hewan jantan yang mati secara mendadak, serta terhadap hewan-hewan langka yang sedang ditangkarkan tetapi tidak dapat kawin secara normal karena kondisi tempat penangkaran yang tidak sesuai dengan kondisi habitat aslinya. Bahkan Tollner *et al.* (1990), Sankai *et al.* (1994), dan Feradis *et al.* (2001) melaporkan selalu berhasil membekukan sperma epididimis monyet ekor panjang yang diaspirasi dari hewan hidup serta Anel *et al.* (1999) pada beruang. Bravo *et al.* (2000) melaporkan angka kebuntingan sebesar 37.5% pada llama dan alpaca yang diinseminasi dengan sperma epididimis yang telah dibekukan.

Penyimpanan epididimis pada suhu 5°C sebelum sperma dikoleksi serta masih dapat dipertahankan motilitas dan kemampuan fertilitasnya telah dilaporkan pada mencit (Jishage *et al.*, 1997; Songsasen *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Kishikawa *et al.*, 1999; dan Sankai *et al.*, 2001), babi (Kikuchi *et al.*, 1998), kucing (Yu dan Leibo, 2002), dan rusa merah (Soler *et al.*, 2003).

Pada percobaan ini dilakukan pengenceran sperma yang dikoleksi dari bagian cauda epididimis domba yang telah dipotong. Epididimis disimpan di dalam lemari es hingga tiga hari sebelum spermanya dikoleksi. Ini dimaksudkan sebagai model untukantisipasi di daerah-daerah terpencil yang tidak memungkinkan dilakukan pengolahan sperma, sehingga epididimis harus ditranspor ke tempat pengolahan yang mungkin membutuhkan waktu beberapa hari.

Metode Penelitian

Protokol Percobaan

Testis beserta epididimis diperoleh dari rumah pematangan hewan (RPH)

kemudian ditranspor ke laboratorium menggunakan larutan NaCl fisiologis. Epididimis dipisahkan dari testis kemudian sebagian dikoleksi sperma dari bagian ekor (cauda). Epididimis yang lain dimasukkan ke dalam gelas piala dan diisi dengan larutan NaCl fisiologis kemudian disimpan di dalam lemari es (suhu 5°C).

Perlakuan lama penyimpanan epididimis yang dicobakan adalah sebagai berikut:

1. Sperma langsung dikoleksi segera setelah epididimis tiba di laboratorium (H-0, sekitar tiga jam setelah domba dipotong).
2. Sperma dikoleksi setelah epididimis disimpan selama satu hari (H-1).
3. Sperma dikoleksi setelah epididimis disimpan selama dua hari (H-2).
4. Sperma dikoleksi setelah epididimis disimpan selama tiga hari (H-3).

Sperma dikoleksi dengan cara membedah cauda epididimis menggunakan gunting *stainless steel* steril kemudian dibilas dengan larutan pengencer Tris (Tabel 1) sebanyak 2 ml. Sperma hasil koleksi dievaluasi kualitasnya meliputi: konsentrasi, persentase motilitas, dan persentase hidup. Sperma hasil koleksi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan supernatan dibuang. Sedimen (sperma) diencerkan kembali dengan pengencer Tris pada konsentrasi 100 juta sperma motil per 0,50 ml.

Konsentrasi sperma: dihitung dengan menggunakan hemositometer. Sperma hasil koleksi (tidak diencerkan) diletakkan di atas gelas objek kemudian disedot dengan pipet eritrosit hingga angka 0.5 kemudian ditambahkan dengan larutan NaCl 3% hingga angka 101 dan dihomogenkan. Konsentrasi dihitung pada lima kamar hitung Neubauer (Toelihere, 1993).

Tabel 1. Komposisi Modifikasi Pengencer Tris

Bahan	Jumlah
Tris(<i>hydroxymethyl</i>)aminomethane (g)	3,32
Asam sitrat-monohidrat (g)	1,86
D(-)Fruktosa (g)	1,37
Laktosa-monohidrat 60 mM (g)	2,16
Glutation (g)	0,05
Kuning telur ayam ras (ml)	20
Penisilin-G (IU/ml)	1000
Streptomisin sulfat ($\mu\text{g/ml}$)	1000
Akuabidestilata <i>ad</i> (ml)	100

Sumber: Rizal (2003).

Persentase motilitas: persentase sperma yang bergerak progresif. Ditentukan secara subjektif pada delapan pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Angka yang diberikan berkisar antara 0% hingga 100% dengan skala 5%.

Persentase hidup: persentase sperma yang hidup. Ditentukan dengan menggunakan pewarnaan eosin (Toelihere, 1993). Sperma yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah dengan jumlah sperma yang dievaluasi minimal 200.

Analisis Data

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan enam kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh Lama Penyimpanan Epididimis Terhadap Kualitas Sperma Segar Hasil Koleksi

Hasil penelitian diperoleh konsentrasi sperma rata-rata 13993,33 juta/ml (berkisar antara 13530 – 14520 juta/ml). Konsentrasi sperma cauda epididimis domba sebesar 37000 – 63000 juta/ml (Tomes *et al.*, 1979) dan 50000 – 74000 juta/ml pada sapi (Bearden dan Fuquay, 1997). Hasil yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan Suhendra (2002) bahwa konsentrasi sperma cauda epididimis sapi sebesar 3593 – 4406,7 juta/ml, dan pada monyet ekor panjang yakni rata-rata 67 juta/ml (Feradis *et al.*, 2001). Perbedaan ini diduga karena perbedaan jenis hewan percobaan serta metode penghitungan dan pengoleksian sperma. Feradis *et al.* (2001) mengoleksi sperma dengan cara aspirasi langsung menggunakan spuit jarum suntik pada cauda epididimis hewan yang masih hidup, sehingga sperma yang teraspirasi jumlahnya terbatas.

Penyimpanan epididimis selama nol dan satu hari menghasilkan persentase motilitas dan persentase hidup yang nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan penyimpanan

oleh Soler *et al.* (2003) bahwa persentase motilitas sperma epididimis rusa merah pada perlakuan kontrol dan yang disimpan selama satu hari pada suhu 5°C nyata lebih tinggi dibandingkan dengan yang disimpan selama dua, tiga, dan empat hari. Lubbe *et al.* (1999) melaporkan persentase motilitas sperma epididimis badak setelah diencerkan sebesar 70 – 75%, 38-77% pada kuda (Squires *et al.*, 2000) dan 57,60% pada rusa merah (Soler *et al.*, 2003).

Terjadinya penurunan kualitas sperma seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan epididimis pada suhu 5°C diduga disebabkan kondisi lingkungan mikro epididimis mengalami perubahan dari kondisi alami seperti yang terjadi pada hewan hidup. Kondisi lingkungan mikro yang dimaksud bukan hanya faktor suhu, tetapi seluruh kondisi di dalam epididimis akan mengalami perubahan. Semakin lama penyimpanan epididimis akan semakin menurunkan kualitas seluruh senyawa-senyawa kimia yang ada di dalamnya, yang pada akhirnya menurunkan daya preservasinya terhadap sperma yang terkandung di dalam cauda epididimis. Menurut Bearden dan Fuquay (1997) kondisi ideal yang terjadi di dalam cauda epididimis pada hewan yang masih hidup merupakan perpaduan dari hasil kerja sekian banyak mekanisme yang

kompleks, yang tidak mungkin dapat dipenuhi pada perlakuan *in vitro*.

Menurut Tomes *et al.* (1979) kandungan natrium dan klorida cauda epididimis domba lebih rendah daripada rete testis, tetapi kandungan kalium, fosfat, dan protein lebih tinggi. Kandungan gliserilfosforilkolin (GPC) dan karnitin juga tinggi. Menurut Bearden dan Fuquay (1997) kondisi optimum cauda epididimis karena pH rendah, viskositas tinggi, CO₂ tinggi, rasio K:Na tinggi, adanya pengaruh testosteron (testosteron berpengaruh positif terhadap fungsi epididimis), dan kombinasi faktor-faktor lain menyebabkan rendahnya metabolisme, sehingga dapat memperpanjang daya tahan hidup sperma. Selanjutnya dinyatakan kondisi seperti ini tidak dapat diciptakan diluar epididimis. Pada penyimpanan epididimis secara *in vitro* di dalam lemari es, kondisi mikro seperti yang tersebut di atas akan mengalami perubahan dan memang tidak dikontrol sehingga tercipta lingkungan yang persis sama dengan kondisi alami hewan hidup. Pada kondisi penyimpanan secara *in vitro* dapat dipastikan bahwa mekanisme-mekanisme yang kompleks tidak akan berjalan lagi sebagaimana yang terjadi pada hewan hidup. Dengan tidak berjalannya mekanisme-

Tabel 2. Rata-rata Kualitas Sperma Segar Cauda Epididimis setelah Penyimpanan

Parameter	Perlakuan			
	H-0	H-1	H-2	H-3
Persentase motilitas (%)	71,25 ± 2,16 ^c	70,00 ± 0,00 ^c	61,25 ± 2,16 ^b	51,67 ± 2,36 ^a
Persentase hidup (%)	82,83 ± 1,57 ^b	79,17 ± 1,07 ^b	69,83 ± 2,91 ^a	66,17 ± 4,81 ^a

^{a b c} Superskrip yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

mekanisme itu akan berpengaruh buruk terhadap integritas sel sperma yang berakibat terganggunya metabolisme dan pada akhirnya menurunkan daya hidup sel itu sendiri.

Pengaruh Lama Penyimpanan Epididimis Terhadap Kualitas Sperma Cair

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama penyimpanan epididimis semakin menurunkan persentase motilitas dan persentase hidup sperma semen cair selama empat hari penyimpanan pada suhu 5°C (Tabel 3 dan 4). Hal ini sesuai dengan hasil yang diperoleh pada kualitas sperma segar (Tabel 2). Rendahnya kualitas sperma segar akan memberikan pengaruh yang besar terhadap menurunnya kualitas sperma yang telah diencerkan dan

disimpan di dalam lemari es.

Hal ini disebabkan karena sperma segar telah mengalami penurunan kualitas dan jumlah sperma yang mati lebih banyak setelah penyimpanan epididimis selama dua dan tiga hari. Banyaknya sperma yang mati juga akan menjadi racun bagi sperma yang masih hidup selama proses penyimpanan. Sperma yang mati diasumsikan memiliki membran plasma yang rusak dan itu mungkin disebabkan karena tingginya derajat peroksidasi lipida akibat adanya radikal bebas, yang pada akhirnya menyebabkan terjadi reaksi otokalitik pada seluruh media terdapat radikal bebas dan zat oksidan lain dalam jumlah yang banyak, penambahan zat antioksidan seperti glutathion tidak akan

Tabel 3. Rata-rata Persentase Motilitas Sperma selama Empat Hari Penyimpanan

Perlakuan	Penyimpanan hari ke-			
	1	2	3	4
%			
H-0	71,25 ± 2,16 ^c	60,00 ± 0,00 ^d	47,50 ± 2,50 ^b	36,25 ± 2,16 ^b
H-1	70,00 ± 0,00 ^c	52,50 ± 2,50 ^c	43,75 ± 2,16 ^b	30,00 ± 0,00 ^a
H-2	61,25 ± 2,16 ^b	46,67 ± 2,36 ^b	36,67 ± 2,36 ^b	26,67 ± 2,36 ^a
H-3	51,67 ± 2,36 ^a	38,75 ± 2,16 ^a	33,75 ± 2,16 ^a	28,75 ± 2,16 ^a

^{a b c} Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

Tabel 4. Rata-Rata Persentase Hidup Sperma selama Empat Hari Penyimpanan

Perlakuan	Penyimpanan hari ke-			
	1	2	3	4
%			
H-0	82,25 ± 1,48 ^b	70,25 ± 1,48 ^c	63,75 ± 1,09 ^c	56,50 ± 1,66 ^c
H-1	79,00 ± 1,22 ^b	64,00 ± 2,12 ^b	59,25 ± 2,77 ^b	47,50 ± 3,04 ^b
H-2	69,00 ± 2,74 ^a	61,00 ± 3,56 ^b	47,67 ± 3,30 ^a	40,67 ± 2,49 ^a
H-3	64,50 ± 5,02 ^a	50,00 ± 2,34 ^a	44,25 ± 1,09 ^a	39,00 ± 2,24 ^a

^{a b c} superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

glutation tidak akan memberikan pengaruh yang banyak terhadap timbulnya peroksidasi lipida pada membran plasma sperma yang lain. Ini menyebabkan rusaknya membran plasma sperma yang masih hidup. Rusaknya membran plasma menyebabkan terganggunya metabolisme dan produksi ATP juga menurun, sehingga mengganggu motilitas sperma karena sumber energi (ATP) tidak tersedia dengan cukup. Menurut Beconi *et al.* (1993) penambahan antioksidan di dalam pengencer tidak akan memberikan pengaruh positif yang optimal terhadap peningkatan kualitas sperma jika kualitas sperma awal semen sangat rendah.

Squires *et al.* (2000) melaporkan persentase motilitas sperma epididimis kuda setelah didinginkan pada suhu 5°C berkisar 27 – 65%. Sedangkan Lubbe *et al.* (1999) melaporkan persentase motilitas sperma epididimis badak yang telah diencerkan adalah 55%, 44%, dan 35% masing-masing 6, 12, dan 18 jam setelah disimpan pada suhu 4°C. Persentase motilitas perlakuan H-0 dan H-1 sebesar 47,50% dan 43,75% pada hari ketiga penyimpanan. Ini menunjukkan bahwa untuk perlakuan H-0 dan H-1 sperma yang telah diencerkan dapat disimpan selama dua hari pada suhu 5°C dan masih memenuhi syarat digunakan dalam program IB.

Pada perlakuan H-2 maksimal disimpan selama satu hari, sedangkan untuk perlakuan H-3 harus langsung diinseminasikan segera setelah sperma dikoleksi dan diencerkan. Menurut Toelihere (1993) serta Hafez dan Hafez (2000) semen yang layak digunakan dalam program IB harus memiliki persentase motilitas paling sedikit sebesar 40%. Pada hari keempat pe-

nyimpanan untuk perlakuan H-0 memiliki nilai persentase motilitas dan persentase hidup yang hampir sama dengan hasil penelitian Rizal (2003) pada pengenceran semen hasil ejakulasi domba Garut. Ini menunjukkan bahwa daya hidup sperma yang dikoleksi dari epididimis tidak berbeda dengan sperma hasil ejakulasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penyimpanan epididimis selama tiga hari di dalam lemari es menghasilkan sperma segar yang masih layak digunakan dalam program IB dan FIV. Sperma yang telah diencerkan dan disimpan selama dua hari di dalam lemari es masih memenuhi syarat untuk digunakan dalam program IB pada perlakuan H-0 dan H-1, sedangkan pada perlakuan H-2 hanya selama satu hari penyimpanan, dan H-3 harus langsung diinseminasikan segera setelah sperma dikoleksi dan diencerkan.

Daftar Pustaka

- An, T.Z., S. Wada, K. Edashge, T. Sakurai, and M. Kasai. 1999. Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38:27-34.
- Anel, L., F. Martinez, M. Alvarez, E. Anel, J.C. Boixo, M. Kaabi, P. Paz, C. Chamorro, and P. Herraiz. 1999. Post-mortem spermatozoa recovery and freezing in a cantabric brown bear (*Ursus arctos*): A preliminary report. *Theriogenology* 51(1):277.
- Axner, E., C.L. Forsberg, and S. Einarsson. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different region of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 45:767-777.

- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1997. Applied Animal Reproduction, 4th Edition. Prentice Hall, New Jersey.
- Beconi, M.T., C.R. Francia, N.G. Mora, and M.A. Affranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40:841-851.
- Bravo, P.W., V. Alarcon, and R.H. Bondurant. 2000. Epididymal spermatozoa characteristics and its use on artificial insemination of llamas and alpacas. Proceeding 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000.
- Feradis, D. Pawitri, I.K. Suatha, M. Rizal Amin, T.L. Yusuf, D. Sajuthi, I.N. Budiarsa, and E.S. Hayes. 2001. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol* 30:100-106.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animals, 7th Edition. Lippicott Williams & Wilkins, Baltimore.
- 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* 14:45-48.
- 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.
- 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.
- Lubbe, K., R.L. Smith, P. Bartels, and R.A. Godke. 1999. Freezing epididymal sperm from white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) treated with different cryodiluents. *Theriogenology* 51(1):288.
- Rizal, M. 2003. Pengaruh penambahan glutation ke dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen cair domba Garut. *Buletin Peternakan* 27(2):63-72.
- Sankai, T., K. Terao, R. Yanagimachi, F. Cho, and Y. Yoshikawa. 1994. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 101:273-278.
- Sankai, T., H. Tsuchiya, and N. Ogonuki. 2001. Short-term non-frozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55:1759-1768.
- Soler, A.J., M.D. Perez-Guzman, and J.J. Garde. 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphology integrity. *J Exp Zool* 295A:188-199.
- 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.
- Squires, E.L., C. Gomez-Cuetara, and J.K. Graham. 2000. Effect of seminal plasma on cryopreserving epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. Proceeding 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Suhendra. 2002. Kajian beberapa parameter kualitas spermatozoa sapi pada tiap bagian epididimis. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Tollner, T.L., C.A. van de Voort, J.W. Overstreet, and E.Z. Drobnis. 1990. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 90:347-352.
- Tomes, G.L., D.E. Robertson, and Lightfoot. 1979. Sheep Breeding, 2nd Edition. Butterworths, London.
- Yu, I. and S.P. Leibo. 2002. Recovery of motile, membrane intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57:1179-1190.