

PENGARUH PENGERINGBEKUAN TERHADAP PERUBAHAN MORFOLOGI SPERMATOZOA DOMBA

Oleh: Takdir Saili¹, Mohamad Agus Setiadi², Srihadi Agungpriyono³,
Mozes R. Toelihere², dan Arief Boediono³

ABSTRACT

Freeze drying is a technology of choice in cell preservation and have been widely applied in many types of cell include spermatozoa. So far, the successful of freeze drying in spermatozoa is limited only in rodents such as mouse and rabbit. Therefore, the technology should be applied in farm animal such as sheep to prove whether the successful would be obtained. Moreover, the information related to membrane plasm and acrosome status and morphological changes on ram spermatozoa after freeze drying and storage was very poor. The staining procedure was applied to prove the membrane plasm and acrosome changes on spermatozoa. The results revealed that the membrane plasm and acrosome of freeze-dried ram spermatozoa was disrupted and most of spermatozoa have morphological abnormally in its stail. Whereas during storage in refreegerator (4-5°C) up 9 months, both membrane plasm and acrosome and morphological changes on spermatozoa tend to be stable.

Key words : freeze drying, spermatozoa, membrane plasm, acrosome

PENDAHULUAN

Penelitian tentang metode pengawetan spermatozoa dengan cara pengeringbekuan telah dilakukan pada beberapa pusat penelitian baik di Amerika (Ward *et al.* 2003), Jepang (Hoshi *et al.* 1994) maupun Australia (Pangestu *et al.* 2001). Metode ini pada awalnya dikembangkan untuk menjawab permasalahan dalam mengamankan sumber gamet jantan hewan percobaan (mencit) hasil rekayasa. Beberapa laboratorium yang menggunakan hewan mencit sebagai uji coba manipulasi genetik memilih untuk mengamankan sumber gamet jantan dalam kemasan spermatozoa hasil pengeringbekuan daripada memelihara pejantan mencit untuk mendapatkan sumber gamet (Kaneko *et al.* 2003; Ward *et al.* 2003). Hal ini dapat dipahami karena pemeliharaan hewan jantan memerlukan waktu dan biaya. Demikian halnya dengan penyimpanan spermatozoa dalam kemasan beku di dalam nitrogen cair membutuhkan peralatan dan biaya tambahan serta suplai nitrogen yang terus menerus selama penyimpanan. Sedangkan hasil pengawetan spermatozoa yang menggunakan metode pengeringbekuan dapat disimpan pada lemari es (suhu 3-5 °C) atau suhu kamar sehingga

dapat ditransportasikan dari satu tempat ke tempat lain dengan mudah.

Pada proses pengeringbekuan, spermatozoa terlebih dahulu dipapar pada nitrogen cair dengan suhu -196°C untuk mendapatkan sediaan spermatozoa dalam keadaan beku. Selanjutnya dilakukan sublimasi untuk menguapkan fase air yang telah membeku sehingga pada akhirnya akan didapatkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering. Kedua proses ini berpotensi dapat mengubah morfologi spermatozoa bahkan mungkin dapat menghentikan fungsi biologis spermatozoa tersebut. Weitze dan Petzoldt (1992) melaporkan bahwa pendinginan dan pembekuan (Bag *et al.* 2002) dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan membran akrosom spermatozoa. Kerusakan membran ini pada gilirannya akan menurunkan viabilitas spermatozoa bahkan dapat menyebabkan kematian bagi spermatozoa. Namun demikian, dengan menggunakan metode *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI), spermatozoa yang telah mengalami kerusakan membran plasma dan akrosom masih mempunyai kemampuan untuk membuahi sel telur.

Sejauh ini pengawetan spermatozoa dengan cara pengeringbekuan masih terbatas pada hewan laboratorium seperti mencit

¹) Staf Pengajar Jurusan Produksi Ternak Fakultas Pertanian Universitas Haluoleo, Kendari.

²) Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor.

³) Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor

(Wakayama *et al.* 1998) dan kelinci (Liu *et al.* 2004). Pada hewan ternak, upaya pengawetan spermatozoa dengan cara pengeringbekuan telah dilakukan oleh Kwon *et al.* (2004) pada babi dan Keskinetepe *et al.* (2002) pada sapi, sedangkan pada ternak domba belum pernah dilaporkan. Selain itu, informasi tentang pengaruh pengeringbekuan terhadap perubahan morfologi spermatozoa sangat dibutuhkan untuk mengetahui kondisi membran plasma dan akrosom spermatozoa hasil pengeringbekuan. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan evaluasi terhadap perubahan morfologi spermatozoa domba setelah proses pengeringbekuan dan penyimpanan di dalam lemari es (3-5°C) dengan menggunakan metode pewarnaan. Evaluasi terhadap kualitas semen dan spermatozoa segar juga akan dilakukan sebagai pembandingan spermatozoa hasil pengeringbekuan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi dan Laboratorium Riset Anatomi serta Unit Rehabilitasi Reproduksi dan Unit Produksi Bahan Biologis Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor sejak bulan Juni 2004 sampai dengan bulan Maret 2005.

Bahan yang digunakan adalah semen domba yang diperoleh secara berkala dari seekor domba jantan lokal dengan kisaran umur tiga sampai empat tahun dan bobot badan \pm 45 kg. Beberapa jenis medium yang digunakan pada penelitian ini adalah medium NaCl 0.032M dengan tekanan osmotik 53-63 mOsmol/l untuk pengamatan status membran plasma spermatozoa, medium formal salin untuk pengamatan keutuhan tudung akrosom spermatozoa dan medium *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7.2 untuk pencuci dan pelarut spermatozoa. Selain itu juga digunakan larutan eosin B 2% (Sigma, E8017) untuk pengamatan persentase spermatozoa hidup.

Di dalam proses pengeringbekuan digunakan tiga jenis medium, yaitu medium *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) yang mengandung EDTA 50 mM, NaCl 50

mM dan penyangga Tris-HCl 10 mM, medium *ethylene glycol-bis [beta-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) yang mengandung EGTA 50 mM, NaCl 50 mM dan penyangga Tris-HCl 10 mM, dan medium *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7.2 masing-masing sebagai medium pelarut spermatozoa serta nitrogen cair untuk membekukan spermatozoa sebelum dikeringkan.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat vagina buatan yang digunakan untuk penampungan semen. Sedangkan untuk membuat dan menyimpan medium digunakan alat timbang, mikropipet, gelas ukur, gelas erlemeyer dan botol kecil dalam berbagai ukuran. Gelas obyek dan gelas penutup digunakan untuk membuat preparat spermatozoa bagi berbagai keperluan pengamatan yang menggunakan mikroskop. Haemocytometer dan sentrifus masing-masing digunakan sebagai alat untuk menghitung konsentrasi spermatozoa dan mencuci spermatozoa. Di dalam proses pembuatan spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan menggunakan metode pengeringbekuan digunakan tube berpenutup ulir 1.5 ml (*Cryo-tube, Greiner*) untuk menyimpan spermatozoa serta mesin pengeringbekuan (*Flexy-dry*) dan lemari es masing-masing untuk membuat sediaan spermatozoa hasil pengeringbekuan dan untuk menyimpan spermatozoa hasil pengeringbekuan. Selain itu juga digunakan kertas indikator pH, *water bath*, *magnetic stirer*, pencatat waktu dan lain-lain.

Koleksi dan evaluasi semen dan spermatozoa segar dilakukan dengan cara menampung semen seekor domba jantan lokal dengan menggunakan vagina buatan. Selanjutnya dilakukan evaluasi terhadap semen dan spermatozoa baik secara makroskopis (volume, warna, konsistensi dan derajat keasaman semen) maupun mikroskopis (gerakan massa, persentase motilitas, konsentrasi, persentase membran plasma utuh, persentase hidup dan persentase tudung akrosom utuh serta abnormalitas spermatozoa).

Volume semen diketahui dengan cara membaca skala pada tabung penampung

semen. Demikian halnya dengan warna semen dapat langsung dilihat pada tabung penampung semen tersebut segera setelah semen ditampung. Sedangkan konsistensi semen diketahui dengan cara mengamati laju aliran semen pada dinding tabung. Aliran semen yang cepat digolongkan ke dalam konsistensi semen yang encer sedangkan aliran semen yang lambat digolongkan ke dalam konsistensi semen yang kental. Derajat keasaman (pH) semen diketahui dengan cara meneteskan semen di atas kertas indikator pH berskala 6.8 sampai 8.0. Perubahan warna pada kertas pH tersebut disesuaikan dengan standar perubahan warna yang menunjukkan nilai pH pada tabel.

Gerakan massa spermatozoa diketahui dengan cara membuat tetesan semen pada gelas obyek kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 10X. Sedangkan persentase motilitas spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 40X pada enam lapang pandang. Penilaian yang diberikan mulai nol persen (tidak ada spermatozoa yang bergerak ke depan) sampai 100 persen (semua spermatozoa bergerak ke depan).

Perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan secara bersamaan dengan penentuan keutuhan membran plasma spermatozoa. Hal ini dimungkinkan karena spermatozoa diencerkan dengan larutan yang dipakai untuk *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOS-Test) yaitu NaCl 0.032M dan tekanan osmotik 53-63 mOsmol l⁻¹. Metode ini merupakan modifikasi metode yang dikembangkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang berasal dari Correa dan Zavos (1994). Sampel semen diencerkan 300 kali menggunakan larutan HOS dan dibiarkan selama lima menit pada suhu kamar. Untuk keperluan pengamatan, diteteskan 10 µl sampel semen pada gelas *haemocytometer* dan evaluasi dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 10X. Perhitungan dilakukan pada lima kotak teracak terhadap spermatozoa yang mempunyai ekor melingkar (membran plasma utuh) maupun yang

mempunyai ekor lurus (membran plasma tidak utuh). Jumlah total kedua jenis spermatozoa yang dihitung pada lima kotak teracak tersebut (Sh) merupakan faktor yang dipergunakan dalam mengestimasi konsentrasi spermatozoa yang menggunakan rumus (Hafez 1987): $KS = Sh \times FM \times P$. *dimana*: KS = konsentrasi spermatozoa; Sh = jumlah spermatozoa yang terhitung pada haemocytometer; FM = faktor multiplikasi dan P = pengenceran

Penentuan spermatozoa hidup dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan eosin. Sebanyak 10 µl sampel semen dan 10 µl eosin B 2% dicampur di atas gelas obyek kemudian dibuat preparat ulas dan dibiarkan mengering sebelum dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 20X. Spermatozoa yang dikategorikan hidup adalah spermatozoa yang tidak menyerap zat warna sehingga pada bagian kepala spermatozoa tidak terwarnai (putih), sedangkan spermatozoa yang dikategorikan mati adalah spermatozoa yang menyerap zat warna sehingga pada bagian kepalanya akan berwarna merah. Persentase hidup spermatozoa ditentukan berdasarkan perbandingan antara jumlah spermatozoa hidup dengan jumlah total spermatozoa. Jumlah total spermatozoa yang yang dihitung adalah 200 spermatozoa.

Keutuhan tudung akrosom spermatozoa dievaluasi menggunakan larutan formal saline. Sebanyak 10 µl sampel semen dimasukkan ke dalam 1 ml larutan formal saline dan diinkubasi pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan sebanyak 200 spermatozoa di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 20X. Spermatozoa yang memperlihatkan lingkaran tudung akrosom dikategorikan sebagai spermatozoa dengan tudung akrosom utuh, sebaliknya spermatozoa yang tidak memperlihatkan lingkaran tudung akrosom dikategorikan sebagai spermatozoa dengan tudung akrosom yang tidak utuh. Sedangkan pengamatan abnormalitas spermatozoa dilakukan terhadap spermatozoa yang mempunyai kelainan baik pada kepala maupun ekor spermatozoa, yang meliputi kepala besar atau

kecil, berkepala dua atau berekor dua dan kondisi abnormal yang lain. Pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 40X dilakukan pada 200 spermatozoa.

Sediaan spermatozoa dalam bentuk kering diperoleh melalui penerapan metode pengeringbekuan yang diadopsi dari Kaneko *et al.* (2003) dengan sedikit modifikasi. Secara jelas dapat diuraikan sebagai berikut. Sejumlah 100 μ l (2×10^9 spermatozoa ml^{-1}) semen domba dimasukkan ke dalam tube 1.5 ml kemudian ditambahkan medium pelarut EDTA, EGTA atau PBS dengan pH 8.0 sebanyak 1.3 ml. Selanjutnya campuran semen tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Fraksi spermatozoa yang berada di bagian atas tube diambil secara perlahan-lahan dan dipindahkan masing-masing sebanyak 100 μ l ke dalam tube berpenutup ulir 1.5 ml (*Cryotube, Greiner*). Tube tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair hingga proses pengeringbekuan dimulai. Proses pengeringbekuan diawali dengan pemasangan tube ke alat pengeringbekuan, selanjutnya mesin dijalankan dan proses pengeringbekuan berjalan hingga terbentuk tepung spermatozoa di dalam tube tersebut. Tube selanjutnya dilepas dari mesin pengeringbekuan, ditutup rapat, divakum dengan menggunakan syringe 10 ml dan disimpan di dalam lemari es (3-5°C) hingga digunakan.

Evaluasi terhadap perubahan morfologi spermatozoa dilakukan secara berkala yaitu, pada bulan ketiga, keenam dan kesembilan setelah pengeringbekuan dan penyimpanan di dalam lemari es (3-5°C). Hasil evaluasi digolongkan ke dalam tiga kategori, yaitu spermatozoa utuh, spermatozoa dengan ekor abnormal dan spermatozoa dengan ekor putus (terpisah antara kepala dan ekor). Hasil perhitungan ini kemudian dibandingkan dengan morfologi spermatozoa segar berdasarkan ketiga kategori di atas. Jumlah spermatozoa yang diamati pada setiap perlakuan adalah 300 spermatozoa.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3 x 3 dengan tiga ulangan. Faktor pertama adalah jenis medium pelarut spermatozoa yang terdiri atas medium EDTA, EGTA dan PBS. Sedangkan faktor kedua adalah waktu pengeringbekuan spermatozoa di dalam mesin pengeringbekuan yang terdiri atas satu, dua dan tiga jam. Dengan demikian akan terdapat sembilan kombinasi perlakuan, yaitu medium EDTA dengan lama pengeringbekuan masing-masing satu jam (EDTA-1), dua jam (EDTA-2) dan tiga jam (EDTA-3) dan medium EGTA dengan lama pengeringbekuan masing-masing satu jam (EGTA-1), dua jam (EGTA-2) dan tiga jam (EGTA-3) serta medium PBS dengan lama pengeringbekuan masing-masing satu jam (PBS-1), dua jam (PBS-2) dan tiga jam (PBS-3).

Data perubahan morfologi spermatozoa hasil pengeringbekuan dianalisis menggunakan program SPSS versi 13 dengan taraf pengujian 5%. Hasil evaluasi semen segar disajikan dalam bentuk rata-rata dan standar deviasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Semen Segar

Evaluasi semen segar dilakukan untuk mengetahui kualitas semen dan spermatozoa domba pada awal penelitian sebelum diproses lebih lanjut. Evaluasi ini dibagi dalam dua kategori, yaitu evaluasi secara makroskopis dengan perhatian utama pada semen yang meliputi pengukuran volume, konsistensi, warna serta pH semen dan evaluasi secara mikroskopis dengan perhatian utama pada individu dan massa spermatozoa yang meliputi perhitungan konsentrasi, gerakan massa, persentase motilitas, persentase hidup, persentase membran plasma utuh dan persentase tudung akrosom utuh serta abnormalitas spermatozoa. Hasil evaluasi semen dan spermatozoa segar domba yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil evaluasi semen segar domba penelitian

Variabel	Nilai
Volume (ml ejakulat ⁻¹)	0.67±0.19
Warna	Putih – krem
Konsistensi	Kental
pH	7.05±0.20
Konsentrasi (juta ml ⁻¹)	3052.00±13.18
Gerakan massa	++(+)
Persentase motilitas (%)	77.33±2.58
Persentase membran plasma utuh (%)	83.33±0.94
Persentase tudung akrosom utuh (%)	83.83±1.61
Persentase hidup (%)	85.26±1.16
Abnormalitas (%)	6.33±0.82

Volume Semen

Volume semen yang dihasilkan seekor pejantan domba dalam satu ejakulasi cukup bervariasi dan sangat tergantung dari umur, berat, status kesehatan dan reproduksi, kualitas makanan, frekuensi penampungan dan bangsa domba (Toelihere 1993). Domba yang digunakan pada penelitian ini adalah domba jantan lokal dengan kisaran umur tiga sampai empat tahun (berdasarkan pergantian gigi) dan bobot badan ±45 kg. Nilai rata-rata volume semen yang diperoleh pada domba tersebut adalah 0.67±0.19 ml. Hasil ini lebih rendah dari nilai rata-rata volume semen domba lokal Bogor (Toelihere 1993), yaitu 0.8-1.2 ml, tetapi lebih tinggi dibanding volume semen domba ekor gemuk di Jawa Timur 0.3-0.4 ml (Pamungkas *et al.* 1996).

Konsistensi dan Warna Semen serta Konsentrasi Spermatozoa

Konsistensi dan warna semen umumnya dijadikan indikator untuk memprediksi konsentrasi spermatozoa yang terdapat di dalam semen secara cepat. Pada keadaan yang normal dapat diasumsikan bahwa semen yang kental akan mengandung spermatozoa dengan konsentrasi yang tinggi. Semen domba yang digunakan pada penelitian ini mempunyai konsistensi yang kental dan berwarna putih sampai krem serta konsentrasi 3052.00±13.18 juta ml⁻¹. Inounu *et al.* (2001) melaporkan bahwa warna semen domba garut berkisar antara bening sampai krem dengan konsistensi encer hingga kental dan konsentrasi 950-4080

juta ml⁻¹. Sedangkan Feradis (1999) menyatakan bahwa semen domba *st. Croix* rata-rata berwarna krem dengan konsistensi yang kental dan konsentrasi 3785 juta ml⁻¹.

Derajat Keasaman (pH) Semen

Derajat keasaman (pH) semen merupakan salah satu faktor pembatas kelangsungan hidup spermatozoa di dalam semen. Perubahan pH ke arah yang lebih asam (angka lebih kecil dari 7) akibat penimbunan asam laktat hasil metabolisme anaerob dapat menurunkan tingkat kelangsungan hidup spermatozoa (Toelihere 1993). Derajat keasaman semen domba yang diperoleh pada penelitian ini masih berkisar pada pH netral, yaitu pH 7.05±0.20. Toelihere (1993) melaporkan bahwa pH semen domba lokal Bogor berkisar 6.2-7.0, sedangkan Rizal (2005) melaporkan bahwa pH semen domba Garut berkisar antara 6.8-7.2.

Gerakan Massa dan Persentase Motilitas Spermatozoa

Spermatozoa bergerak dalam kelompok (massa) yang menyerupai awan dengan pola yang bergelombang sehingga akan terlihat perubahan gelombang tebal dan tipis. Menurut Toelihere (1993), penilaian pergerakan massa spermatozoa dibagi ke dalam beberapa kategori, yaitu sangat baik (+++), baik (++), cukup (+) dan jelek (N, *necrospermia* atau O, *oligospermia*). Gerakan massa spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini berkisar antara baik (++) dan sangat baik (+++). Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan pergerakan massa spermatozoa dapat dijadikan indikator untuk memprediksi motilitas individu spermatozoa. Sebagai pembandingan dapat dikemukakan bahwa gerakan massa spermatozoa domba garut rata-rata 2.89 (berkisar antara 2 dan 3 pada skala 1-3) (Rizal 2005), sedangkan Inounu *et al.* (2001) melaporkan bahwa nilai rata-rata gerakan massa spermatozoa domba Garut adalah 2.81 (berkisar antara 1 dan 4 pada skala 1-4).

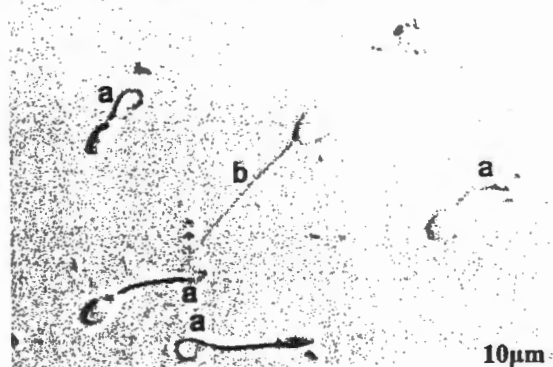
Persentase motilitas spermatozoa merupakan salah satu indikator utama dalam proses evaluasi spermatozoa. Variabel ini sangat erat hubungannya dengan daya fertilisasi spermatozoa. Nilai rata-rata persentase motilitas spermatozoa domba yang digunakan pada penelitian ini adalah $77.33 \pm 2.58\%$. Nilai ini masih pada kisaran persentase motilitas spermatozoa yang layak digunakan untuk fertilisasi, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Wuwuh (1990) melaporkan bahwa persentase motilitas spermatozoa domba Priangan berkisar 66-80% dan domba lokal Bogor rata-rata 75% (Toelihere 1993). Sedangkan Rizal (2005) melaporkan bahwa persentase motilitas domba Garut rata-rata 77.07%.

Keutuhan Membran Plasma dan Akrosom

Keutuhan membran plasma bagi spermatozoa mutlak diperlukan untuk memenuhi fungsinya sebagai pelindung organel di dalam sel dan penyaring bagi pertukaran zat intraseluler dan ekstraseluler. Demikian halnya dengan kondisi tudung akrosom yang harus tetap utuh untuk menjaga keamanan enzim-enzim fertilisasi yang terdapat di dalam vesikel akrosom. Untuk mengamati keutuhan membran plasma spermatozoa digunakan larutan NaCl 0.032M dengan tekanan osmotik 53-63 mOsmol l^{-1} . Tekanan osmotik sel mamalia termasuk sel spermatozoa rata-rata 300 mOsmol l^{-1} , sehingga spermatozoa dengan membran plasma utuh yang dipapar pada cairan hipoosmotik tersebut akan mengalami penggembungan (*swollen*) akibat difusi air dari luar ke dalam sel dan ekor spermatozoa akan melingkar (Gambar 1a). Hal ini tidak muncul pada spermatozoa yang membran plasmanya tidak utuh lagi (Gambar 1b).

Nilai rata-rata keutuhan membran plasma spermatozoa semen segar yang diperoleh pada penelitian ini adalah $83.33 \pm 0.94\%$, sedangkan nilai rata-rata keutuhan tudung akrosomnya adalah $83.83 \pm 1.61\%$. Kedua nilai tersebut masih pada kisaran nilai normal untuk variabel yang dimaksud jika dihubungkan dengan kemampuan fertilisasi seperti yang dikemukakan oleh Revell dan Mrode (1994) bahwa nilai persentase keutuhan membran

plasma yang kurang dari 60% dikategorikan sebagai spermatozoa yang infertil.



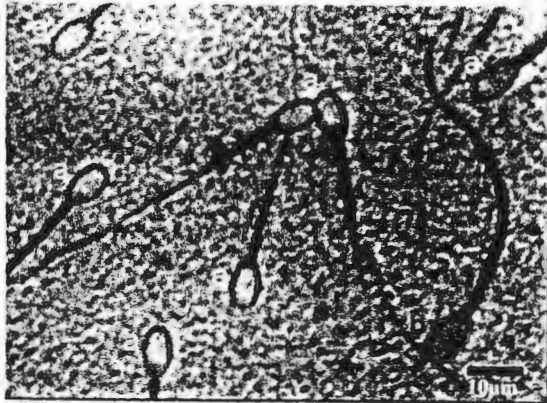
Gambar 1. Spermatozoa dengan membran plasma utuh (ekor melingkar, a) dan spermatozoa dengan membran plasma tidak utuh (ekor lurus, b).

Persentase Spermatozoa Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa.

Pemeriksaan fungsi membran untuk menentukan persentase hidup spermatozoa juga dapat dilakukan dengan menggunakan pewarna eosin B yang dicampur dengan ion sodium. Spermatozoa yang hidup masih mempunyai sistem membran yang berfungsi termasuk fungsi pengaturan ion terutama ion sodium. Hal ini akan menyebabkan penahanan difusi medium pewarna (eosin B) yang mengandung ion sodium oleh sistem membran pada saat pemaparan spermatozoa ke dalam medium pewarna. Akibatnya spermatozoa tidak terwarnai oleh pewarna eosin B (Gambar 2a). Sebaliknya pada spermatozoa mati, sistem membrannya telah rusak sehingga dengan mudah dapat dilewati eosin B dan spermatozoa akan berwarna merah (Gambar 2b).

Abnormalitas spermatozoa merupakan salah satu faktor yang menjadi pertimbangan dalam menilai kelayakan semen yang digunakan pada inseminasi buatan. Toelihere (1993) mengatakan bahwa semen domba yang baik apabila mempunyai persentase abnormalitas kurang dari 14%. Sedangkan Hafez dan Hafez (2000) menetapkan nilai abnormalitas pada kisaran 5-20%. Nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 6.33 ± 0.82 . Nilai ini masih berada pada kisaran nilai

abnormalitas spermatozoa yang memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut.



Gambar2. Spermatozoa hidup dengan kepala berwarna putih (a) dan spermatozoa mati dengan kepala berwarna merah (b)

Evaluasi Perubahan Morfologi Spermatozoa setelah Pengerimbekuan.

Evaluasi perubahan morfologi spermatozoa dilakukan secara bertahap, yaitu pada bulan ketiga, keenam dan kesembilan setelah proses pengerimbekuan. Perubahan morfologi yang berhubungan dengan keutuhan spermatozoa dibagi tiga kategori, yaitu spermatozoa utuh, spermatozoa dengan ekor abnormal dan spermatozoa dengan ekor putus (terpisah antara kepala dan ekor) (Gambar3).



Gambar 3. Spermatozoa utuh (a), spermatozoa dengan ekor abnormal (b) spermatozoa dengan ekor putus (c)

Hasil evaluasi terhadap perubahan morfologi spermatozoa berdasarkan lama

penyimpanan setelah pengerimbekuan dapat dilihat berturut-turut pada Tabel 2, 3 dan 4.

Tabel 2. Perubahan morfologi spermatozoa hasil pengeringbekuan setelah disimpan 3 bulan pada suhu 3-5°C

Perlakuan	Perubahan morfologi (%)			Total (%)
	Utuh	Ekor abnormal	Ekor putus	
EDTA-1	30(10)	255(85) ^{ac}	15(5) ^{bd}	300(100)
EDTA-2	21(7)	249(83) ^{ac}	30(10) ^{ac}	300(100)
EDTA-3	24(8)	240(80) ^{bc}	36(12) ^a	300(100)
EGTA-1	18(6)	261(87) ^a	21(7) ^{bc}	300(100)
EGTA-2	24(8)	261(87) ^a	15(5) ^{bd}	300(100)
EGTA-3	27(9)	258(86) ^{ac}	15(5) ^{bd}	300(100)
PBS-1	21(7)	261(87) ^a	18(6) ^{bc}	300(100)
PBS-2	24(8)	252(84) ^{ac}	24(8) ^{acd}	300(100)
PBS-3	24(8)	249(83) ^{ac}	27(9) ^{acd}	300(100)
Total	213(7.9)	2286(84.7)	201(7.4)	2700(100)

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf uji 5%

Tabel 3. Perubahan morfologi spermatozoa hasil pengeringbekuan setelah disimpan 6 bulan pada suhu 3-5°C

Perlakuan	Perubahan morfologi (%)			Total (%)
	Utuh	Ekor abnormal	Ekor putus	
EDTA-1	30(10) ^a	246(82) ^{ac}	24(8) ^{bde}	300(100)
EDTA-2	18(6) ^{ac}	243(81) ^{bc}	39(13) ^{ac}	300(100)
EDTA-3	18(6) ^{ac}	246(82) ^{ac}	36(12) ^{acd}	300(100)
EGTA-1	18(6) ^{ac}	258(86) ^{ac}	24(8) ^{bde}	300(100)
EGTA-2	24(8) ^{ac}	258(86) ^{ac}	18(6) ^{bc}	300(100)
EGTA-3	24(8) ^{ac}	261(87) ^a	15(5) ^b	300(100)
PBS-1	15(5) ^{bc}	255(85) ^{ac}	30(10) ^{acc}	300(100)
PBS-2	15(5) ^{bc}	243(81) ^{bc}	42(14) ^a	300(100)
PBS-3	18(6) ^{ac}	246(82) ^{ac}	36(12) ^{acd}	300(100)
Total	180(6.7)	2256(83.6)	264(9.8)	2700(100)

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf uji 5%

Nilai rata-rata persentase tertinggi spermatozoa hasil pengeringbekuan yang masih utuh setelah disimpan tiga bulan pada suhu 3-5°C diperoleh pada perlakuan EDTA-1 (10%) dan EGTA-3 (9%) tetapi tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan yang lain. Pada penyimpanan enam bulan, nilai rata-rata persentase tertinggi spermatozoa hasil pengeringbekuan yang utuh diperoleh pada perlakuan EDTA-1 (10%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan perlakuan PBS-1 (5%) dan PBS-2 (5%) tetapi tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan EDTA-2 (6%),

EDTA-3 (6%), EGTA-1 (6%), EGTA-2 (8%), EGTA-3 (8%) dan PBS-3 (6%). Demikian halnya dengan penyimpanan 9 bulan, nilai rata-rata persentase tertinggi spermatozoa hasil pengeringbekuan yang utuh diperoleh pada perlakuan EDTA-1 (9%) dan EGTA-3 (8%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan perlakuan PBS-1 (4%), PBS-2 (4%) dan PBS-3 (4%) tetapi tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan EDTA-2 (5%), EDTA-3 (5%), EGTA-1 (6%) dan EGTA-2 (7%).

Untuk kategori spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan ekor abnormal setelah disimpan tiga bulan pada suhu 3-5°C, nilai rata-rata persentase terendah diperoleh pada perlakuan EDTA-3 (80%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan perlakuan EGTA-1 (87%), EGTA-2 (87%) dan PBS-1 (87%), tetapi tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan EDTA-1 (85%), EDTA-2 (83%), EGTA-3 (86%), PBS-2 (84%) dan PBS-3 (83%). Pada penyimpanan 6 bulan, rata-rata persentase terendah spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan ekor abnormal diperoleh pada perlakuan EDTA-2 (81%) dan perlakuan PBS-

2 (81%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan perlakuan EGTA-3 (87%), tetapi tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan yang lain. Sedangkan pada penyimpanan 9 bulan, rata-rata persentase terendah spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan ekor abnormal diperoleh pada perlakuan EDTA-1 (81%), EDTA-2 (81%) dan PBS-2 (81%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan perlakuan EGTA-2, tetapi tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan EDTA-3 (82%), EGTA-1 (85%), EGTA-3 (86%), PBS-1 (84%) dan PBS-3 (82%).

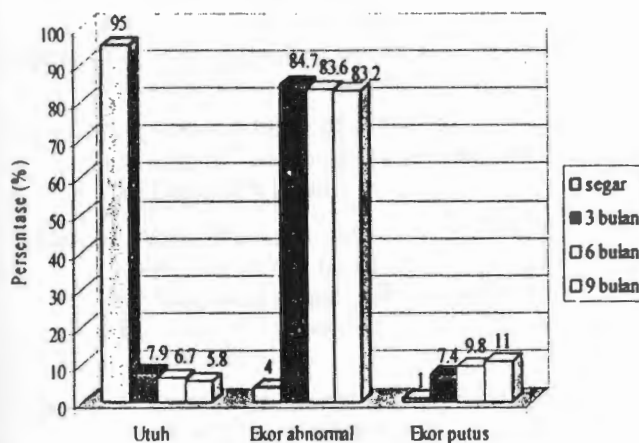
Tabel 4. Perubahan morfologi spermatozoa hasil pengeringbekuan setelah disimpan 9 bulan pada suhu 3-5°C

Perlakuan	Perubahan morfologi (%)			Total (%)
	Utuh	Ekor abnormal	Ekor putus	
EDTA-1	27(9) ^a	243(81) ^{bc}	30(10) ^{ad}	300(100)
EDTA-2	15(5) ^{ac}	243(81) ^{bc}	42(14) ^{ac}	300(100)
EDTA-3	15(5) ^{ac}	246(82) ^{ac}	39(13) ^{ac}	300(100)
EGTA-1	18(6) ^{ac}	255(85) ^{ac}	27(9) ^{bc}	300(100)
EGTA-2	21(7) ^{ac}	261(87) ^a	18(6) ^{bd}	300(100)
EGTA-3	24(8) ^a	258(86) ^{ac}	18(6) ^{bd}	300(100)
PBS-1	12(4) ^{bc}	252(84) ^{ac}	36(12) ^{ac}	300(100)
PBS-2	12(4) ^{bc}	243(81) ^{bc}	45(15) ^a	300(100)
PBS-3	12(4) ^{bc}	246(82) ^{ac}	42(14) ^{ac}	300(100)
Total	156(5.8)	2247(83.2)	297(11)	2700(100)

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf uji 5%

Sedangkan untuk kategori spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan ekor putus setelah disimpan selama tiga bulan pada suhu 3-5°C, nilai rata-rata persentase terendah diperoleh pada perlakuan EGTA-2 (5%), EGTA-3 (5%) dan EDTA-1 (5%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan perlakuan EDTA-2 (10%) dan EDTA-3 (12%). Pada penyimpanan selama 6 bulan nilai rata-rata persentase terendah diperoleh pada perlakuan EGTA-3 (5%) yang berbeda nyata dengan perlakuan EDTA-2 (13%), EDTA-3 (12%), PBS-1 (10%), PBS-2 (14%) dan PBS-3 (12%). Pada penyimpanan sembilan bulan, nilai rata-rata persentase terendah spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan ekor putus diperoleh

pada perlakuan EGTA-2 (6%) dan EGTA-3 (6%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan semua perlakuan kecuali perlakuan EGTA-1 (9%). Bahkan nilai terbesar didapatkan pada perlakuan PBS-2 (15%) yang berbeda nyata ($P<0.05$) dengan semua perlakuan EGTA baik satu, dua maupun tiga jam.



Gambar 4. Persentase perubahan morfologi spermatozoa hasil pengeringbekuan pada semua perlakuan setelah disimpan selama 3, 6 dan 9 bulan pada suhu 3-5°C

Berdasarkan kategori yang ditetapkan dapat diketahui bahwa nilai rata-rata persentase spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan ekor abnormal pada semua perlakuan sangat mendominasi baik pada masa penyimpanan tiga bulan (84.7%), enam bulan (83.6%) maupun sembilan bulan (83.2%) dibandingkan spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan ekor putus masing-masing 7.4% (tiga bulan), 9.8% (enam bulan) dan 11% (sembilan bulan) serta spermatozoa hasil pengeringbekuan yang utuh 7.9% (tiga bulan), 6.7% (enam bulan) dan 5.8% (sembilan bulan). Hasil ini berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan morfologi spermatozoa segar dengan nilai rata-rata persentase spermatozoa utuh yang mendominasi (95%) diikuti spermatozoa dengan ekor abnormal (4%) dan spermatozoa dengan ekor putus (1%) (Gambar 4).

Hal ini menunjukkan bahwa selama proses pengeringbekuan baik pada tahap pembekuan di dalam nitrogen cair maupun pada tahap sublimasi di dalam mesin pengeringbekuan terjadi perubahan kondisi ekstrim yang menyebabkan bagian ekor spermatozoa menjadi rapuh sehingga mudah terpotong atau berubah bentuk menjadi abnormal. Kaneko *et al.* (2003) menyatakan bahwa proses pengeringbekuan akan merusak

komponen struktural spermatozoa. Selain itu juga terjadi pemisahan kepala dan ekor spermatozoa. Namun demikian, beberapa penelitian menunjukkan bahwa kondisi ekor spermatozoa dan membran plasma yang utuh tidak diperlukan pada metode fertilisasi ICSI (Ward *et al.* 2003; Said *et al.* 2003). Ekor spermatozoa yang utuh hanya dibutuhkan pada metode fertilisasi *in vitro* konvensional untuk membantu pergerakan spermatozoa melakukan fertilisasi, sedangkan membran plasma dan akrosom spermatozoa dibutuhkan untuk melindungi enzim-enzim fertilisasi sebelum digunakan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: (1) Spermatozoa hasil pengeringbekuan mengalami kerusakan membran plasma dan akrosom yang dibuktikan melalui teknik pewarnaan dan bagian ekor spermatozoa sebagian besar mengalami perubahan setelah pengeringbekuan dan (2) Perubahan morfologi spermatozoa banyak terjadi pada saat pengeringbekuan, sedangkan pada saat penyimpanan pada lemari es (3-5°C) morfologi spermatozoa cenderung stabil.

DAFTAR PUSTAKA

- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. 2002. Effect of freezing temperature, at which straw were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 72:175-183.
- Correa JR, Zavos PM. 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42:351-360.
- Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus pada Program Inseminasi Buatan Domba St. Croix. Disertasi. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Hafez ESE. 1987. *Reproduction in Farm Animals*. 5th edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hoshi K, Yanagida K, Katayose H, Yazawa H. 1994. Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zygote* 2:237-242.
- Inounu I, Hidajati N, Jarmani SN, Priyanto D, Hastono SB, Subandriyo. 2001. Pengaruh interaksi genetik dan lingkungan terhadap produksi domba persilangan dan domba lokal pada beberapa lokasi pengamatan: evaluasi kualitas semen domba hasil persilangan. Di dalam Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bagian "Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II". Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor. hlm 64-73.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. 2003. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 68:136-139.
- Keskintepi L *et al.* 2002. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 67:409-415.
- Kwon IK, Park KE, Niwa K. 2004. Activation, pronuclear formation, and development *in vitro* of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 71:1430-1436.
- Liu JL *et al.* 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 70:1776-81.
- Pamungkas D, Affandhy L, Umiyasih U. 1996. Pertumbuhan, libido dan kualitas semen domba ekor gemuk yang diberi pakan dengan kandungan gizi yang berbeda. Di dalam Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Cisarua, Bogor 7-8 Nopember 1995. hlm 495-464.
- Pangestu M, Lewin L, Shaw J, Lacham-Kaplan O, Trounson A. 2001. Evaluation of embryo development after ICSI with dried mouse spermatozoa. *Theriogenology*
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36:77-86.
- Rizal Amin M. 2005. *Fertilitas Spermatozoa Ejakulat dan Epididimis Domba Garut Hasil Kriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris dengan Berbagai Krioprotektan dan Antioksidan*. Disertasi. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Said S, Saili T, Tappa B. 2003. Pengaktifan dan pemuahan sel telur tikus setelah disuntik dengan kepala spermatozoa. *Hayati* 10:96-99
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Ward MA *et al.* 2003. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod* 69:2100-2108.
- Weitze KF, Petzoldt R. 1992. Preservation of semen. *Anim Reprod Sci* 28:229-235.
- Wuwuh MIS. 1990. *Telaah Kualitas Semen Domba Priangan dan Silangan Suffolk-Priangan serta Upaya Inseminasi Buatan dan Superovulasi*. Disertasi. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.