Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kucing Selama Penyimpanan Pada Suhu 4°C

Motility and Membrane Integrity of Cat Epididymal Sperm During Storage at 4 °C

Yulnawati[1] dan M. Agus Setiadi[2]

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

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

Abstract

The aim of this present study was to investigate the progressive motility and membrane integrity of cat epididymal spermatozoa during storage at 4 °C. Spermatozoa was collected by flushing technique with physiological saline and diluted in Tris egg yolk extender for three d ays. The result showed that mean concentration of spermatozoa from cauda epididymal was 108,40 ± 81,49.10^6spz/ml. The percentage of progressive motility and membrane integrity of spermatozoa on day-0 (time of collection) was 74,50 ± 3,50 % and 80,82 ± 2,00 %, respectively. The percentage of progressive motility on day-1 was 62.5 ± 5.59 % and significantly higher(P<0,05) than day-2 (50.5 ± 5.68 %) and day-3 (25.5 ± 9.60 %). There was also significantly different on the percentage of membrane integrity on day-1(71.54 ± 2.50 %), day-2 (64.16 ± 4.15 %) and day-3 (50.03 ± 4.16 %) of storage at 4°C. In conclusion ,the spermatozoa derived from cat cauda epididymal could be used for artificial insemination after 2 days of storage at 4 °C.

Key words: epididymal sperm, storage, cat

Pendahuluan

Penyelamatan material genetik dari hewan mati dapat dilakukan dengan bantuan teknik reproduksi yang telah banyak berkembang. Pada hewan jantan, epididimis dapat digunakan sebagai sumber material genetik yang bisa disimpan untuk jangka waktu yang tidak terbatas (Rizal *et al.* 2004a; Hori *et al.* 2004; Nazlie 2004; Tsutsui *et al*. 2003b; Sankai *et al.* 2001; Axner *et al.* 1998). Lebih lanjut dinyatakan bahwa spermatozoa yang berasal dari bagian cauda epididimis memiliki kemampuan membuahi seperti halnya spermatozoa yang berasal dari ejakulasi (Hafez dan Hafez 2000). Spermatozoa tersebut dapat digunakan untuk tujuan inseminasi buatan/IB, *in vitro embryo production*/IVEP, *intra cytoplasmic sperm injection*/ICSI dan embrio yang dihasilkan dapat digunakan untuk embrio transfer, sehingga akan diperoleh keturunan yang baru.

Pada sebagian besar spesies, spermatozoa tetap dapat bertahan hidup di cauda epididimis untuk paling tidak dua sampai tiga minggu (Setchell *et al.* 1993). Kondisi ini menjadi pertanyaan besar kemungkinan spermatozoa asal cauda epididimis dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama pada kondisi buatan. Untuk tujuan IB, spermatozoa dapat disimpan terlebih dahulu dalam bentuk semen cair maupun semen beku. Semen diencerkan menggunakan bahan pengencer yang mengandung *buffer*, sumber energi, antibiotik dan lipoprotein yang dapat mempertahankan kualitasnya selama penyimpanan. Dalam bentuk semen cair, semen ejakulat dapat disimpan selama empat hari pada suhu 4ºC dengan motilitas lebih dari 40% sehingga masih layak digunakan untuk IB. Selama ini pendekatan komposisi pengencer yang sudah diaplikasikan secara meluas biasanya menirukan komposisi dari plasma semen dimana spermatozoa berada. Namun demikian kondisi lingkungan yang berbeda dari spermatozoa asal cauda epididimis dan ejakulat menjadi menarik untuk diperhatikan apakah pengencer yang umum digunakan untuk spermatozoa dari ejakulat dapat cocok untuk spermatozoa asal cauda epididimis.

Untuk melakukan fertilisasi, spermatozoa harus bergerak mencapai tempat pembuahan dengan menggunakan energi yang diperoleh dari pengencer, sehingga motilitas sering dijadikan indikator fertilitas spermatozoa. Namun demikian pergerakan spermatozoa dipengaruhi juga oleh integritas struktur morfologi spermatozoa. Sementara itu dilaporkan bahwa perubahan yang sangat nyata pada spermatozoa selama penyimpanan dalam bentuk semen cair adalah penurunan secara bertahap dari motilitas dan integritas morfologi spermatozoa (Maxwell and Salamon, 1993). Oleh karenanya penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh penyimpanan pada suhu 4^{o}C terhadap motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa asal cauda epididimis kucing sehingga nantinya dapat diaplikasikan pada jenis karnivora lain baik hewan kesayangan maupun hewan yang terancam punah seperti harimau, yang ditemukan mati sehingga material genetiknya dapat digunakan untuk menyelamatkan jenis hewan tersebut dari ancaman kepunahan.

Metode Penelitian

Sebanyak sepuluh ekor kucing jantan dengan berat badan berkisar antara 2,8 - 4,41 kg dikastrasi untuk diambil testisnya. Bagian cauda epididimis dipisahkan dan dibersihkan dari bagian tunika dartos dan tunika albuginea serta lapisan yang menyelimuti. Selanjutnya dilakukan pembilasan dengan cara menyemprotkan larutan NaCl fisiologis ke cauda epididimis menggunakan spuit 10 cc dan jarum berukuran 20G. Larutan yang mengandung spermatozoa tersebut ditampung dalam tabung falcon 15 ml, kemudian disentrifugasi menggunakan kecepatan 1100 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan dilakukan penghitungan konsentrasi spermatozoa menggunakan kamar hitung Neubauer, pengamatan terhadap persentase motilitas progresif dan keutuhan membran plasma (MPU) hari ke-0. Spermatozoa epididimis selanjutnya diencerkan dan disimpan pada suhu 4°C selama tiga hari.

Bahan pengencer yang digunakan terdiri dari 2,40 g Tris (*hydroxymehthyl*) 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 persentase motilitas progresif dan membran plasma utuh (MPU). Persentase motilitas merupakan persentase spermatozoa yang bergerak progresif ke depan. Evaluasi dilakukan dengan cara mengamati spermatozoa pada sepuluh lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 x. Angka yang diberikan berkisar antara 0% hingga 100%.

Evaluasi terhadap keutuhan membran plasma spermatozoa (persentase MPU) dilakukan dengan menggunakan metode *hypoosmotic swelling test* (HOS Test). Pengujian dilakukan menggunakan metoda Rodriquez-gil *et al.* (1994) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 0,1 ml semen dicampur dengan 9,9 ml medium hipoosmotik. Medium hipoosmotik dibuat dengan melarutkan 0,3 g fruktosa (Sigma, USA) dan 0,7 g Na Citrat (Sigma, USA) ke dalam 100 ml aquabidestilata. Setelah dicampurkan, sediaan diinkubasi dalam inkubator CO_2 bersuhu 37^{0}C selama 45 menit. Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Penilaian dilakukan dengan sistim skor 0% sampai 100%. Data dianalisis dengan analisis ragam rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan waktu penyimpanan dan sepuluh kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

Hasil dan Pembahasan

Spermatozoa yang berasal dari cauda epididimis kucing memiliki konsentrasi yang cukup beragam dengan rataan sebesar 108,40 ± 81,49 juta spermatozoa/ml. Tingkat kepadatan spermatozoa yang tinggi dalam cauda epididimis masih dimungkinkan karena belum mengalami penambahan volume oleh kelenjar asesoris, sehingga konsentrasi spermatozoa masih sangat padat. Kualitas spermatozoa yang berasal dari sepuluh pasang epididimis kucing yang dikoleksi dengan cara pembilasan /H-0 terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas Spermatozoa Epidydidmis Kucing H-0

Parameter	Hasil
Konsentrasi (10^6spz/ml)	108,40 ± 81,49 (11 – 289)
Persentase motilitas (%)	74,50 ± 3,50
Persentase MPU (%)	80,82 ± 2,00

H-0: Hari saat koleksi spermatozoa dari epididimis.

Rataan konsentrasi spermatozoa yang diperoleh dalam penelitian ini berbeda dengan laporan Tsutsui *et al.* (2003b) yang menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa bagian ekor epididimis sebesar 58-64 juta spermatozoa/ml. Hal ini diduga disebabkan adanya perbedaan teknik koleksi spermatozoa yang dilakukan, jenis kucing yang digunakan, umur, dan nutrisi dari hewan tersebut. Pada domba konsentrasi spermatozoa epididimisnya berkisar antara 2080-3460 juta spermatozoa/ml (Rizal *et al.* 2004a) dan pada sapi sebesar 3593-4406,7 juta spermatozoa/ml (Suhendra 2002).

Persentase motilitas progresif yang diperoleh dari penelitian ini sebesar 74,50 ± 3,50% lebih tinggi daripada beberapa penelitian pada kucing yakni 66,5 ± 4,8 dan 67,0 ± 4,5% untuk epididimis bagian kiri dan kanan (Tsutsui *et al*. 2003b) ; 67,5 % (Nazlie 2004) dan 71,2 ± 2,0% (Goodrowe dan Hay 1999). Sedangkan persentase motilitas pada spermatozoa anjing yang berasal dari bagian cauda epididimis adalah sebesar 89,4 ± 1,6% (Hori *et al.* 2004). Data tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa yang berasal dari bagian cauda epididimis telah memiliki motilitas yang cukup untuk dapat digunakan dalam proses IB. Secara umum pada bagian cauda epididimis, spermatozoa mengalami pematangan dengan menghilangkan residu phosphotyrosine dari bagian kepala spermatozoa (Lewis dan Aitken 2001) sehingga memiliki daya motilitas dan fertilitas yang setara dengan spermatozoa yang terdapat dalam ejakulat. Di samping itu, protein tertentu yang disekresikan oleh epididimis dapat meningkatkan motilitas spermatozoa selama penyimpanan *in vitro* (Reyes-Moreno *et al.* 2002). Spermatozoa yang berasal dari cauda epididimis memiliki rataan penyerapan calsium 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). Namun spermatozoa yang berasal dari cauda epididmis kucing memiliki persentase abnormalitas (*distal cytoplasmic droplets)* yang lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa ejakulat (Axner *et al.* 1998). Adanya *cytoplasmic droplet* berhubungan dengan ketidakseimbangan maturasi spermatozoa atau disfungsi (Roca *et al.* 1992) namun *distal cytoplasmic droplets* tidak menjadi masalah serius untuk fertilitas normal.

Persentase MPU yang diperoleh sebesar 80,82 ± 2,00%. Hasil ini berbeda dengan yang diperoleh Rizal *et al.* (2004b) pada domba sebesar 81,33 ± 1,10%. Perbedaan tersebut diakibatkan oleh perbedaan jenis hewan yang digunakan. Spermatozoa mencit yang disimpan pada suhu 5°C dapat mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasmanya selama penyimpanan 8 hari (Sankai *et al.* 2001)

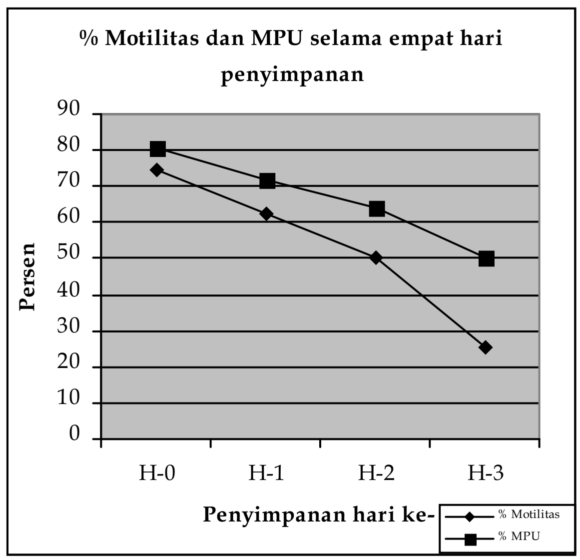
Selama penyimpanan persentase motilitas menunjukkan penurunan (Tabel 2). Hingga hari kedua penyimpanan motilitas spermatozoa masih berada diatas 50% dan masih dapat digunakan untuk keperluan IB. Semen yang layak digunakan untuk IB adalah yang dapat memenuhi syarat motilitas progresif minimal 40% (Hafez dan Hafez 2000) dan MPU tidak kurang dari 60% (Revell dan Mrode 1994). Pada hari ketiga rataan motilitas hanya 25,50 ± 9,60 %. Rataan yang sangat rendah diakibatkan kisaran motilitas spermatozoa yang sangat jauh yakni dari 10-40%.

Tabel 2. Persentase Motilitas dan Membran Plasma Utuh Selama Empat Hari Penyimpanan

Parameter	% Motilitas Progresif	% MPU
H-0	74.50 ± 3.50	80.82 ± 2.00
H-1	62.50 ± 5.59	71.54 ± 2.50
H-2	50.50± 5.68	64.16 ± 4.15
H-3	25.50 ± 9.60	50.03 ± 4.16

H-0: hari saat koleksi spermatozoa dari epididimis; H-1: hari pertama pengamatan setelah 24 jam penyimpanan; H-2: hari kedua pengamatan setelah 48 jam penyimpanan; H-3: hari ketiga pengamatan setelah 72 jam penyimpanan.

Persentase MPU juga tampak menunjukkan penurunan selama tiga hari penyimpanan (gambar 1). Hingga hari kedua penyimpanan, persentase MPU masih berada diatas 60%, namun pada hari ketiga hanya mencapai 50,03 %.



Gambar 1. Penurunan motilitas progresif dan keutuhan membran plasma spermatozoa selama tiga hari penyimpanan.

Penurunan kualitas spermatozoa selama penyimpanan, baik persentase motilitas progresif maupun keutuhan membran plasma diduga akibat banyaknya spermatozoa yang mati dan menjadi toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga secara umum kualitasnya menjadi menurun. Keberadaan zat yang bersifat toksik baik yang berasal dari spermatozoa yang telah mati maupun yang berasal dari zat yang terkandung dari pengencer yang telah mengalami oksidasi akibat penyimpanan dapat menyebabkan tingginya kadar radikal bebas yang dapat merusak keutuhan membran plasma spermatozoa. Apabila membran plasma spematozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu dan mulai kehilangan motilitasnya sehingga mengakibatkan kematian spermatozoa. Penyimpanan spermatozoa epididimis domba juga menunjukkan kecenderungan penurunan. Pada hari keempat penyimpanan persentase motilitas spermatozoa epididimis domba adalah sebesar 36,25 ± 2,16% (Rizal *et al*. 2004a).

Pada penelitian ini penambahan kuning telur yang mengandung lipoprotein dan lesitin untuk melindungi membran plasma spermatozoa ternyata tidak cukup mampu mempertahankan keutuhan membran plasma dan motilitas spermatozoa epididimis kucing selama tiga hari penyimpanan. Hasil ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Tsutsui *et al.* (2003a) pada spermatozoa epididimis anjing yang disimpan pada suhu 4ºC pada hari keempat penyimpanan dengan persentase motilitas sebesar 60%.

Disisi lain, penurunan kualitas dan adanya variasi motilitas spermatozoa asal cauda epididimis kemungkinan berkaitan dengan komposisi pengencer yang digunakan. Hal ini karena belum adanya informasi tentang pengaruh komponen tertentu pada cairan epididimis pada daya tahan hidup spermatozoa (Setchell *et al.* 1993) sehingga pendekatan sistem pengenceran pada spermatozoa asal cauda epididimis bisa saja berbeda dengan pengencer pada spermatozoa asal ejakulat yang tentu saja memerlukan kajian lebih lanjut.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa spermatozoa asal epididimis kucing yang disimpan pada suhu 4ºC masih memiliki motilitas progresif sebesar 50.5 ± 5.68% dan MPU 64.16 ± 4.15% sampai hari kedua penyimpanan sehingga dapat digunakan untuk keperluan IB. Namun demikian spermatozoa epididimis tersebut masih bisa digunakan untuk tujuan aplikasi teknologi reproduksi seperti *Intra Cytoplasmic Sperm Injection* (ICSI) sampai hari ketiga penyimpanan.

Daftar Pustaka

Axner, E., B. SormHolst, and C. Linde-Forsberg. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. Theriogenology 50 6 : 973-979

Goodrowe, K.L., and M. Hay. 1999. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. Theriogenology 40 : 907-975

Hafez, E.S.E., and B. Hafez. 2000. Reproduction in farm animals. 7th Edition. Baltimore : Lippicott Williams & Wilkins.

Hori, T., M. Ichikawa, E. Kawakami and T. Tsutsui. 2004. Artificial insemination with frozen epididymal sperm beagle dogs. J.Vet.Med.Sci 66(1) : 37-41

Lewis, B., and R.J. Aitken. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited rat spermatozoa. Biol. Reprod. 64 ; 1545-1556

Maxwell, W.M.C., and S. Salamon. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. Reprod. Fertil. Dev. 3(5): 613 - 638

Merkies, K., and M.M. Buhr 1998. Epididymal maturation affects calcium regulation in equine spermatozoa exposed to heparin and glucose. Theriogenology 49 (3): 683-695

Nazlie, C.S. 2004. Kajian kualitas spermatozoa kucing asal epididimis dan ductus deferens setelah proses preservasi selama 7 hari pada suhu 4 °C. Thesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Reyes-Moreno, C., M. Boilard, R. Sullivan, and M.A. Sirard. 2002. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. Biol.Reprod. 66 : 159-166

Revell, S.G., and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Anim. Reprod. Sci. 36:77-86

Rizal, M., Herdis, dan A. Boediono. 2004a. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5°C). J. Anim. Prod. 6(1) : 30-36

Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara, dan PZ. Situmorang. 2004b. Pengaruh waktu penyimpanan epididimis pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa epididimis domba garut. J. Vet. 5(3) : 95-103

Roca, J., E. Martinez, M.A. Sanches-Valverde, S. Ruiz, and JM. Vasquez. 1992. Seasonal variation of semen quality in male goats : study of sperm abnormalities. Theriogenology 38 : 115-125

Rodriguez-Gil, J.E., A. Montserrat, and T. Rigau. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. Theriogenology 42 : 815-830.

Sankai, T., H. Tsuchia, and N. Ogonuki. 2001. Short term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. Theriogenology 55 (8) : 1759-1768

Setchell, B.P., L.G. Sanchez-Partida and A. Chairussyuhur. 1993. Epididymal constituents and related substances in storage of spermatozoa: a review. Reprod. Fertil. Dev. 3(5): 601-612

Suhendra. 2002. Kajian beberapa parameter kualitas spermatozoa sapi pada tiap bagian epididimis. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Tsutsui, T., T. Tezuka, Y. Mikasa, H. Sugisawa, N. Kirihara, T. Hori, and E. Kawakami. 2003a. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. J.Vet.Med.Sci 65 (3) : 307-312

Tsutsui, T., M. Wada, M. Anzai, and T. Hori . 2003b. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. J.Vet.Med.Sci 65 (3) : 397-399