

## Peluang Penggunaan Spermatozoa Epididimis Yang Dikoleksi Setelah Kematian Sebagai Sumber Sel Gamet pada Anjing

### The Possibility of Using Epididymal Spermatozoa Recovered From Postmortem as Source Gametes in Dog

I Ketut Puja<sup>1\*</sup>, IGN Trilaksana<sup>2</sup>, Rudy Lontoh<sup>3</sup>

1. Laboratorium Embriologi dan Genetika,FKH Universitas Udayana, Email address : asubali@hotmail.com.

\* Penulis untuk korespondensi.

2. Bagian Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

3. Dinas Agribisnis, Kota Manado, Sulawesi Utara.

#### Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of postmortem time on percentage of life epididymal sperm from postmortem canine caudae epididymides. A total of 9 dog were used and divided into three group. T0 was control group, T1, 3 hours postmortem and T2, 6 hours postmortem. This way, samples were obtained at different times postmortem. Sperm were extracted from the caudae epididymis by means of cuts. The result showed that the percentage of life sperm were  $67,16 \pm 5.67$ (T0),  $46.33 \pm 5.60$  (T1) and  $24.00 \pm 4.35$  respectively. We could appreciate that percentage of life was affected by postmortem time. There was significant decrease life sperm recovered from epididymides postmortem ( $P < 0.01$ ). In conclusion, epididymal sperm from dog undergo decrease of percentage of life, but it could stay acceptable within many hours postmortem. We interpreted these data to indicate that it may still be possible to obtain viable spermatozoa many hours later.

**Keywords:** canine, epididymal spermatozoa, post mortem

Diterima: 19 Mei 2004 disetujui: 14 Juni 2004

#### Pendahuluan

Mati diartikan sebagai proses penghentian fungsi, penggunaan energi, sintesis, kerja, dan pertumbuhan sel. Sebaliknya kematian diartikan sebagai pengurangan dengan derajat yang berbeda atau hilangnya ciri-ciri fungsi penggunaan energi, sintesis, kerja, dan pertumbuhan sel, pada waktu yang berbeda. Perubahan-perubahan yang terjadi selama setelah proses mati sangat bervariasi dalam hal kecepatan kerusakan sel. Variasi kecepatan kerusakan sel dipengaruhi oleh temperatur, faktor lingkungan, kelembaban, dan kondisi hewan (Hill and Lavia, 1980).

Perubahan yang dikenal juga dengan postmortem ini akan mengakibatkan terjadinya

otolisis organela-organela sel sebagai akibat kekurangan oksigen. Karena itu, pemanfaatan potensi yang masih memungkinkan terbatas pada organ tertentu yang tidak cepat rusak akibat autolisis seperti kornea mata dan ginjal (Pangestu, 1997).

Dengan kemajuan di bidang ilmu reproduksi seperti fertilisasi *in vitro* dan injeksi sperma intra sitoplasma telah memberi peluang untuk pemanfaatan organ gonad atau organ kelamin primer pada hewan yang telah mati. Adanya kemajuan bidang reproduksi ini memungkinkan penggunaan spermatozoa dengan daya hidup yang kecil, oleh karena pada teknik yang disebut mikromanipulasi hanya diperlukan spermatozoa tunggal yang langsung diinjeksikan ke dalam sitoplasma. Yu and Leibo (2002) menyatakan bahwa

spermatozoa yang diambil dari epididimis yang disimpan pada suhu 4<sup>0</sup> C selama delapan hari masih mempunyai motilitas dan kemampuan berikatan dengan zona pelusida sel telur secara *in vitro*. Hal ini disebabkan karena spermatozoa yang ada pada epididimis telah melewati proses pendewasaan di bagian *caput* dan *corpus* epididimis. Watkins *et al.*, 1996 telah berhasil memanfaatkan spermatozoa yang diambil dari penyedotan pada testis untuk diinjeksikan pada sel telur. Meskipun angka fertilisasi sperma yang diambil dari testis secara nyata lebih rendah namun pengambilan spermatozoa langsung dari testis untuk diinjeksikan langsung pada sel telur sangat efektif, efisien dan murah (Watkins *et al.*, 1997). Oleh karena itu sangat memungkinkan menggunakan spermatozoa yang diambil langsung dari epididimis hewan yang telah mati (Smith *et al.*, 1985), meskipun dengan daya hidup yang sangat rendah.

Spermatozoa yang berasal dari epididimis telah mempunyai kemampuan membuahi oosit yang sama baiknya dengan dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Hal ini disebabkan karena spermatozoa telah mengalami proses pendewasaan selama perjalanan dari *caput* epididimis menuju *cauda* epididimis serta sudah mempunyai kemampuan bergerak (Axner *et al.*, 1999).

Telah banyak laporan mengenai kemampuan spermatozoa epididimis untuk membuahi sel telur baik itu secara *in vitro* maupun *in vivo* (Marks *et al.*, 1994; Hewitt *et al.*, 2001). Blash *et al.*, (2000) melaporkan bahwa spermatozoa epididimis yang diambil dari hasil nekropsis pada kambing mempunyai kemampuan membuahi oosit. Hori *et al.*, (2004) melaporkan bahwa spermatozoa epididimis anjing yang dibekukan mempunyai kemampuan untuk membuahi oosit anjing. Yu and Leibo (2003) menyatakan bahwa spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis anjing yang disimpan pada suhu 4<sup>0</sup>C selama delapan hari masih mempunyai kemampuan bergerak (motil), kemampuan berikatan dengan zona pelusida secara *in vitro*.

Spermatozoa yang meninggalkan testis tidak mempunyai cukup pergerakan untuk melakukan fertilisasi. Mereka memperoleh kemampuan untuk fertilisasi selama dalam

perjalanan menuju epididimis. Spermatozoa yang keluar testis tertampung dalam epididimis dan duktus deferens. Jumlah spermatozoa yang berada dalam epididimis dan duktus deferens dipengaruhi ukuran anjing dan frekuensi ejakulasi. Jumlah sperma yang ada pada kepala dan badan epididimis tidak dipengaruhi oleh frekuensi ejakulasi tetapi jumlah di dalam *cauda* epididimis diperkirakan lebih rendah setelah ejakulasi.

Jumlah sperma yang diejakulasikan dipengaruhi oleh faktor umur, ukuran testis, frekuensi ejakulasi dan selang waktu ejakulasi sebelumnya, dan tingkat seksualitas anjing. Frekuensi ejakulasi berpengaruh pada jumlah total spermatozoa setiap ejakulasi. Jika selang waktu ejakulasi lama, saluran masih penuh dan spermatozoa yang tua secara spontan dikeluarkan pada urine. Apabila pengambilan sperma teratur dalam periode tertentu maka produksi sperma harian dapat diperkirakan secara akurat berdasarkan jumlah spermatozoa yang diambil.

Sperma yang diejakulasikan terdiri dari tiga bagian yaitu fraksi pertama adalah fraksi seminal, volumenya mencapai 2 ml. Fraksi pertama ini berwarna jernih dan tanpa mengandung spermatozoa (Kibble, 1969). Fraksi kedua adalah fraksi sperma, volumenya kurang lebih 2-3 ml. Cairan ini seperti susu dan fraksi ketiga adalah fraksi prostat. Ejakulat ini keluar setelah fraksi sperma keluar. Volumenya dapat mencapai 20 ml. Penelitian secara biokimia menunjukkan bahwa fraksi pertama dan fraksi ketiga mempunyai kesamaan sifat. Kedua fraksi tersebut berasal dari kelenjar prostat (England *et al.*, 1990). Pada anjing normal, volume sperma berkisar antara 1 sampai 30 ml. Kandungan spermatozoa pada setiap ejakulasi berkisar antara 300 juta sampai dengan 2 milyar (Johnston, 1991).

Upaya pengolahan spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis untuk aplikasi teknologi reproduksi merupakan metode alternatif yang dapat diterapkan pada hewan yang mempunyai potensi genetik unggul, namun tidak mampu melakukan perkawinan. Metode ini juga akan sangat bermanfaat dalam upaya penyelamatan plasma nutfah atau hewan yang berpotensi genetik tinggi yang mati secara mendadak serta satwa langka yang sedang

ditangkarkan. Sebelum spermatozoa tersebut dapat dimanfaatkan, maka harus diketahui sampai kapan sperma dari suatu hewan yang ditemukan mati masih dapat dimanfaatkan. Dalam konteks ini perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui persentase hidup spermatozoa yang diambil dari epididimis anjing pascamati pada waktu berbeda.

## Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Sebanyak 18 testis dari sembilan ekor anjing lokal jantan berumur 12 sampai 48 bulan yang sudah mencapai dewasa kelamin dan dewasa tubuh. Sampel dibagi menjadi tiga kelompok secara acak yang masing-masing kelompok terdiri dari enam testis. Kelompok pertama (T0): adalah testis yang diambil saat kematian, Kelompok kedua (T1): testis yang diambil tiga jam pascamati. Kelompok kedua (T2): testis yang diambil enam jam pascamati.

Anjing percobaan dibunuh dalam waktu bersamaan. Setelah waktu ditentukan,

testisnya dikeluarkan dari skrotum. Testis diiris dengan pisau bedah pada *cauda epididimis*. Spermatozoa diambil dengan batang gelas steril, diletakkan pada objek gelas. Diteteskan satu tetes larutan eosin negrosin 0,5% dan sebelum dipakai, objek gelas ditaruh pada inkubator suhu 38<sup>0</sup> C. Campuran tadi dihomogenkan dengan memutar ujung batang gelas pada campuran yang ada di atas objek dan selanjutnya ditutup dengan gelas penutup, dan selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop. Dihitung spermatozoa yang hidup dan mati sampai 100 spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian.

## Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian (Tabel 1) menunjukkan bahwa persentase hidup spermatozoa yang diperoleh dari pengambilan pada *cauda epididimis* anjing pada saat kematian (T0), tiga jam pascamati (T1) dan enam jam pascamati (T2) berturut turut adalah 67,16 ± 5,67; 46,33 ± 5,60 dan 24,00 ± 4,35%.

**Tabel 1.** Rata-rata persentase hidup spermatozoa cauda epididimis anjing lokal.

Perlakuan	Persentase Spermatozoa Hidup
To ( Koleksi saat kematian)	67,16 ± 5,67 %
T1 (Koleksi 3 jam pascamati)	46,33 ± 5,60 %
T2 (Koleksi 6jam pascamati)	24,00 ± 4,35%.

Dari analisis varian didapatkan bahwa waktu pengambilan spermatozoa langsung dari epididimis setelah kematian berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap persentase hidup spermatozoa. Terdapat penurunan daya hidup spermatozoa yang nyata setelah kematian. Spermatozoa yang diambil langsung saat kematian menunjukkan persentase hidup yang paling tinggi ( $P < 0,01$ ) dibandingkan dengan perlakuan T1 dan T2. Persentase hidup spermatozoa yang diambil tiga jam pascamati lebih tinggi ( $P < 0,01$ ) dibandingkan enam jam pascamati.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase hidup spermatozoa dipengaruhi oleh lama anjing mati sebelum spermatozoa dikoleksi. Hal ini disebabkan karena semakin

lama anjing mati sebelum spermatozoa dikoleksi, semakin menurun persentase hidup spermatozoa di dalam cairan *cauda epididimis*. Terjadinya penurunan persentase hidup pada penelitian ini kemungkinan disebabkan penurunan penggunaan energi, sintesis, pertumbuhan, dan fungsi organ tersebut (Cheville, 1976).

Spermatozoa yang diambil dari epididimis biasanya mudah rusak karena penanganan waktu membuat preparat (Salisbury and Demark, 1985) dan menurut Rootkustritz (1998) teknik pewarnaan sangat berpengaruh pada pengamatan kualitas spermatozoa. Hafez (1987) menyatakan walaupun lingkungan pada bagian *cauda epididimis* sangat cocok untuk kehidupan

spermatozoa akan tetapi spermatozoa tidak dapat selamanya dalam keadaan hidup. Kemungkinan spermatozoa hanya bertahan beberapa minggu.

Persentase spermatozoa yang mati pada setiap ejakulat bervariasi antara 20% (Christiansen, 1987). Penyimpanan semen pada suhu 38<sup>0</sup> C selama dua jam dapat meningkatkan kematian spermatozoa. Persentase spermatozoa hidup yang dikoleksi setelah tiga jam pascamati berada di bawah rata-rata persentase hidup pada setiap ejakulasi. Walaupun demikian, kemungkinan spermatozoa ini masih dapat digunakan terutama untuk fertilisasi *in vitro*. Hal ini sesuai dengan pendapat Marks, 1994; Hori *et al.*, 2004 yang menyatakan bahwa spermatozoa yang diambil dari epididimis anjing yang telah mati telah memiliki kemampuan untuk membuahi sel telur. Selanjutnya, Yu and Leibo (2002) menyatakan bahwa spermatozoa yang diambil dari epididimis yang disimpan pada suhu 4<sup>0</sup> C selama delapan hari masih mempunyai motilitas dan kemampuan berikatan dengan zona pelusida sel telur secara *in vitro*. Hal ini disebabkan karena spermatozoa epididimis yang ada pada epididimis telah melewati proses pendewasaan di bagian *caput* dan *corpus* epididimis.

Adanya kemajuan bidang reproduksi sangat memungkinkan menggunakan spermatozoa dengan daya hidup yang kecil, oleh karena pada teknik yang disebut dengan mikromanipulasi hanya diperlukan spermatozoa tunggal yang langsung diinjeksikan ke dalam sitoplasma.

## **Kesimpulan dan Saran**

Spermatozoa yang diambil dari epididimis pada anjing pascamati masih mempunyai peluang untuk dipakai sebagai sumber sel gamet dan diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan fertilisasi spermatozoa baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

## **Daftar Pustaka**

- Axner, E., Forsberg, C.L. and Einarsson. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different region of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 45:767-777.
- Blash, S., Melican, D. and Gavin, W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54:899-905.
- Cheville, N.F. 1976. *Cell Pathology*. The Iowa State University Press. Ames
- Christiansen, I.B.J. 1984. *Reproduction in the Dog and Cat*. Bailliere Tindal.
- England, G.C., Allen, W.E. and Middleton, D.J. 1990. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res Vet Sci*. 49:66-70.
- Hafez, E.S.E. 1987. *Reproduction In Farm Animal*. Lea Febiger, Philadelphia.
- Hewwit, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M. and England, G.C. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci*. 67:101-11.
- Hill, R.B.N. and Lavia, M.F. 1980. *Principle of Patobiologic*. Ed. 3<sup>rd</sup>. Oxford University Press.
- Hori, T., Ichikawa, M., Kawakami, E. and Tsutsui, T. 2004. Artificial insemination of frozen epididymal sperm in Beagle dogs. *J Vet Med Sci* 66:37-41.
- Johnston, S.D. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 21:545-551.
- Kibble, R.M. 1969. Artificial insemination in dogs. *Aus Vet.J.* 45:194-199.
- Mark, S.L., Dupuis, J., Mickelsen, W.D., Menon, M.A. and Plattz, C.C. 1944. Conception by use post mortem epididimal semen extraction in the dog. *J Am. Vet Med. Assoc.* 204:1639-1640
- Pangestu, M. 1997. *Potensi spermatozoa epididimis yang diperoleh setelah kematian sebagai sumber sel gamet*. Forum Komunikasi Reproduksi. Denpasar.
- Rootkustritz, M.V., Olson, P.M. and Johnston, S.D. 1998. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *J Am Anim Hosp Assoc.* 34:348-52.

- Salisbury, G.W. and Demark, N.L. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi*. Terjemahan R Djanuar. Fakultas Peternakan Universitas Gajah Mada. Gajah Mada Press.
- Smith, T.P.D., Sotwick, G.J., Yates, C.A., Trounson, A.O. and de Krester, D.M. 1985. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Ferti. Embryo Transfer*.2:119-112.
- Watkins, W., Bourne, H., Nieto, F., Gronov, M. and Baker, G. 1996. Testicular aspiration of sperm for intracytoplasmic sper injection : a novel treatment for ejaculatory failure on the day of oocyte retrieval. *Fertil Steril* 66:660-661
- Watkins, W., Nieto, F., Bourne, H., Wutthipham, B., Speirs, A. and Baker, H.W. 1997. Testicular and epididymal sperm in a microinjection program: methods of retrieval and results. *Fertil Steril* 67:527-535.
- Yu, I. and Leibo, S.P. 2002 Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*.57:1179-1190.