

## Pelacakan Kerusakan Akrosom Spermatozoa Domba Selama Proses Pembekuan dengan Teknik Histokimia Lektin

### (DETECTION OF ACROSOMAL DAMAGE OF RAM SPERMATOZOA DURING FREEZING PROCESS USING LECTIN HISTOCHEMICAL TECHNIQUE)

Lisa Dwi Fannessia<sup>1</sup>, Ni Wayan Kurniani Karja<sup>1,2</sup>,  
I Ketut Mudite Adnyane<sup>3</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana,

<sup>2</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi

<sup>3</sup>Bagian Anatomi, Histologi dan Embriologi,

Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,

Jln Agathis, Kampus Dramaga IPB Bogor, 16680

Telp: 0251-8626460; Email: setiadi03@yahoo.com

### ABSTRAK

Proses pembekuan dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan akrosom spermatozoa sehingga dapat menurunkan fertilitas spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kerusakan akrosom selama proses pembekuan dengan menggunakan teknik histokimia lektin. Semen dikoleksi dari domba garut berumur 1-2 tahun, dua kali dalam satu minggu menggunakan vagina buatan. Segera setelah ditampung, semen dievaluasi karakteristiknya kemudian diencerkan dengan medium *Niwa* dan *Sasaki Freezing* (NSF). Semen dikemas di dalam *mini straw* (0,25 mL) dan diekuilibrasikan pada suhu 4°C selama dua jam. *Straw* kemudian dibekukan serta disimpan dalam tabung nitrogen/N<sub>2</sub> cair. Evaluasi karakteristik spermatozoa (motilitas, viabilitas, dan membran plasma utuh) dan status akrosom dilakukan selama proses pembekuan. Deteksi status akrosom spermatozoa diamati dengan menggunakan metode pewarnaan histokimia lektin yaitu metode *Fluorescens isothiocyanate* (FITC) dan *Avidin-Biotin-Complex* (ABC). Data karakteristik spermatozoa dan status akrosom spermatozoa dianalisis dengan sidik ragam. Persentase motilitas, viabilitas, dan membran plasma utuh spermatozoa sebelum pembekuan (83±2,7%; 88,8±2,6%; 88,2±3,7%) mengalami penurunan (P<0,05) setelah ekuilibrasikan (71,0±4,2%; 84,2±5,0%; 76,2±1,3%) dan setelah *thawing* (40,0±3,5%; 61,08±3,3%; 51,2±10,4%). Persentase akrosom spermatozoa intak dengan metode FITC dan ABC selama proses pembekuan masing-masing adalah 93,63±2,73%; 88,04±3,2% dan 81,73±4,77% vs 94,54±0,26%; 88,17±0,38% dan 79,38±2,06%. Dapat disimpulkan bahwa hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan kualitas spermatozoa selama proses pembekuan. Lebih lanjut, status akrosom spermatozoa dapat dideteksi dengan baik menggunakan kedua metode pewarnaan histokimia lektin.

Kata kunci: akrosom, spermatozoa, pembekuan, lektin

### ABSTRACT

Freezing process in ram spermatozoa caused damage of the plasma membrane and acrosome that lead to the decrease of spermatozoa fertility. Research was conducted to evaluate acrosomal damage during freezing process using lectin histochemical technique. Semen was collected twice a week using artificial vagina from 1-2 years old Garut ram. Immediately after collection, characteristic of semen quality was evaluated then diluted with *Niwa* and *Sasaki Freezing* (NSF) medium. Semen was loaded into 0.25 mL mini straws and equilibrated at 4°C for two hours. Straws were then frozen and stored in liquid nitrogen. Evaluation of sperm characteristic (motility, viability and plasma membrane integrity) and acrosomal integrity were done during the freezing process. Detection of acrosomal integrity was observed using *Fluorescens isothiocyanate* (FITC) and *Avidin-Biotin-Complex* (ABC) staining methods. Data of characteristic spermatozoa and acrosomal integrity were analyzed using ANOVA. Result of the experiments showed that the percentage of motility, viability and plasma membrane integrity of spermatozoa before

freezing ( $83 \pm 2.7\%$ ;  $88.8 \pm 2.6\%$ ;  $88.2 \pm 3.7\%$ ) were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) after equilibration ( $71 \pm 4.2\%$ ;  $84.2 \pm 5.0\%$ ;  $76.2 \pm 1.3\%$ ) and after thawing ( $40 \pm 3.5\%$ ;  $61.08 \pm 3.3\%$ ;  $51.2 \pm 10.4\%$ ). The percentage of intact acrosomal spermatozoa using FITC and ABC methods during freezing process were  $93.63 \pm 2.73\%$ ;  $88.04 \pm 3.2\%$  and  $81.73 \pm 4.77\%$  VS  $94.54 \pm 0.26\%$ ;  $88.17 \pm 0.38\%$  and  $79.38 \pm 2.06\%$ , respectively. In conclusion, the characteristic of spermatozoa were significantly decrease ( $P < 0.05$ ) during freezing process. Furthermore, the integrity of acrosome spermatozoa can be well analyzed during freezing process by using lectin histochemical staining methods.

Key words: acrosome, spermatozoa, freezing, lectin

## PENDAHULUAN

Akrosom memegang peranan penting dalam proses fertilisasi. Inisiasi ikatan spermatozoa dengan zona pelusida memicu terjadinya reaksi akrosom dan menyebabkan pelepasan serta aktivasi dari enzim akrosom, sehingga spermatozoa mampu melakukan penetrasi zona pelusida (Inoue *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2009). Akrosom merupakan derivat dari aparatus Golgi yang terbentuk pada tahap awal spermiogenesis, utamanya terjadi pada fase spermatid (Toshimori dan Ito, 2003). Akrosom terdiri dari enzim-enzim protease, di antaranya proakrosin, hyaluronidase, dan phospholipase (Florman *et al.*, 2008). Letak akrosom pada bagian anterior kepala spermatozoa (Esteves dan Verza Jr, 2011).

Spermatozoa atau semen umumnya disimpan dalam bentuk beku sehingga dapat digunakan dalam jangka waktu yang tidak terbatas. Namun demikian, spermatozoa mamalia sangat rentan mengalami kerusakan morfologi selama proses pembekuan (Partyka *et al.*, 2011), seperti kerusakan membran plasma dan membran akrosom (Bag *et al.*, 2002). Lebih lanjut Partyka *et al.* (2010) dan Hernandez *et al.* (2012) melaporkan bahwa terjadi kenaikan kerusakan akrosom spermatozoa selama proses pembekuan. Kerusakan akrosom dapat digunakan sebagai salah satu indikator penyebab berkurangnya fungsi spermatozoa karena sedikitnya komponen seluler dan inaktivasi dari protein utama sehingga menurunkan fertilitas spermatozoa (Esteves dan Verza Jr, 2011). Oleh karena itu, diperlukan teknik untuk mendeteksi kerusakan akrosom yang efektif dan akurat.

Spermatozoa dari bagian kepalanya sampai ekor dilapisi oleh membran dengan struktur yang sangat kompleks dalam susunan mosaik yang teratur dan memiliki peran biologik spesifik pada permukaannya. Membran plasma spermatozoa diperkirakan terdiri dari 300 protein yang berbeda dan sekitar 92% protein membran ekstraseluler pada semua sel

eukariotik berupa glikokonjugat (Schroter *et al.*, 1999). Glikokonjugat merupakan residu karbohidrat yang berikatan baik dengan lipid (glikolipid) dan protein (glikoprotein) atau dengan struktur molekul lainnya, yang terdapat di bagian antara permukaan sel spermatozoa dengan lingkungan ekstraseluler (Talaie *et al.*, 2010). Glikokonjugat berperan penting dalam berbagai proses sel seperti maturasi, diferensiasi, dan interaksi antar sel (Agungpriyono *et al.*, 2009). Keberadaan glikokonjugat pada permukaan sel dapat dilacak dengan menggunakan teknik histokimia lektin untuk mengetahui status keutuhan membran plasma spermatozoa termasuk status akrosomnya (Purohit *et al.*, 2008).

Teknik histokimia lektin telah banyak digunakan untuk melacak status akrosom spermatozoa pada banyak spesies seperti babi (Siciliano *et al.*, 2008), tikus (Lybaert *et al.*, 2009), ayam (Partyka *et al.*, 2010), kuda (Cocchia *et al.*, 2011), sapi (Odhiambo *et al.*, 2011), kambing (Batista *et al.*, 2011) dan *Canada goose* (Partyka *et al.*, 2011). Pada penelitian ini dilakukan pelacakan kerusakan akrosom spermatozoa domba garut selama proses pembekuan menggunakan dua metode pewarnaan histokimia lektin yaitu metode *Fluorescens isothiocyante* (FITC) dan metode *Avidin-Biotin-Complex* (ABC). Metode FITC merupakan metode pewarnaan satu langkah, pada metode FITC lektin yang telah dilabel fluoresens, berikatan langsung dengan karbohidrat spesifik yang terdapat pada permukaan sel dan diamati dengan menggunakan mikroskop fluoresens, sementara pada metode ABC melibatkan afinitas terhadap molekul avidin-biotin membentuk ikatan kompleks permanen untuk selanjutnya digunakan kromogen *diamino benzidine* (DAB) sebagai substansi penanda membentuk kompleks dengan enzim peroksidase, dan kompleks yang terbentuk dalam kromogen (DAB) menghasilkan warna coklat gelap yang dapat diamati menggunakan mikroskop cahaya (Hsu

*et al.*, 1981; Maji *et al.*, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kerusakan akrosom spermatozoa selama proses pembekuan dengan menggunakan teknik histokimia lektin.

## METODE PENELITIAN

### Koleksi Semen

Semen segar dikoleksi dari domba garut jantan dewasa kelamin yang berumur antara 1-2 tahun dengan bobot badan berkisar antara 25-30 kg. Domba dipelihara secara intensif dalam kandang individu di Unit Rehabilitasi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Pakan hijauan dan konsentrat sebagai sumber pakan pokok bagi domba, sedangkan air minum diberikan secara *ad libitum*. Penampungan semen dilakukan sebanyak dua kali seminggu dengan menggunakan vagina buatan.

### Kriopreservasi Spermatozoa

Semen segar yang sudah dievaluasi karakteristiknya diencerkan dengan medium *Niwa* dan *Sasaki Freezing* (NSF) untuk kemudian dibekukan (Kikuchi *et al.*, 1999; Karja *et al.*, 2006). Semen yang mempunyai karakteristik baik dengan persentase motilitas minimal 70% digunakan dalam proses pembekuan. Dalam proses pembekuan, penambahan bahan pengencer dilakukan dengan metode *two step freezing* yaitu dimulai dengan penambahan medium NSF I kemudian dilakukan ekuilibrasi pada suhu 4°C selama dua jam sebelum ditambahkan dengan medium NSF II dan diekuilibrasi kembali pada suhu yang sama selama lima menit. Komposisi medium *freezing* I (NSF I) terdiri dari 20% (v:v) kuning telur, 8,8% (w/v) laktosa (Merck, Germany) dan 200 µg/mL ampicillin, sedangkan medium *freezing* II (NSF II) terdiri dari 92,52% (v:v) medium *freezing* I, 1,48% (v:v) orvus ES paste, dan 6% (v:v) gliserol. Perbandingan medium NSF I dan NSF II adalah 1:1. Semen dikemas ke dalam *straw* berukuran 0,25 mL (I.V.M., France) kemudian diletakan pada *styrofoam plate* dalam uap nitrogen cair berjarak sekitar 4 cm dari permukaan nitrogen cair selama 20 menit kemudian segera dimasukkan dalam kontainer nitrogen cair dengan suhu -196°C untuk penyimpanan.

### Evaluasi Karakteristik dan Deteksi Status Akrosom

Evaluasi semen selama proses pembekuan (setelah pengenceran, setelah ekuilibrasi, dan setelah *thawing*) dilakukan terhadap karakteristik spermatozoa yang meliputi persentase motilitas, viabilitas, dan membran plasma utuh (MPU) spermatozoa, serta deteksi kerusakan akrosom dengan pewarnaan histokimia lektin. *Thawing* semen beku dilakukan pada penangas air dengan suhu 32°C selama 30 detik. Motilitas spermatozoa dinilai secara subjektif dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali. Evaluasi persentase viabilitas spermatozoa dilakukan dengan metode pewarnaan eosin-nigrosin (Cocchia *et al.*, 2011), sedangkan pengujian keutuhan membran plasma spermatozoa dianalisis menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS-Test) dengan komposisi 0,135 g fruktosa (Merck, Germany) dan 0,0737 g *trisodium citrate* 2H<sub>2</sub>O dalam 10 mL air mili-Q (Perez-Llano *et al.*, 2006).

### Deteksi Status Akrosom

**Teknik Pemeriksaan dengan Metode FITC.** Sampel semen dibuat preparat ulas dan dikeringudarkan pada suhu ruang kemudian difiksasi dalam etanol 96% selama 10 menit pada suhu ruang. Preparat sampel setelah dikeringudarkan ditetaskan larutan lektin *Peanut agglutinin* (PNA) (Sigma, St. Luis MO) sebanyak 30 µL (100 µg/mL) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Preparat kemudian ditetaskan dengan *propidium iodide*/PI (Sigma, St. Luis MO) sebanyak 5µL (1 µg/µL) dan diinkubasi selama lima menit. Setelah inkubasi, preparat kemudian dicuci dengan *phosphate-buffered saline* (PBS) sebanyak tiga kali untuk membersihkan sisa pereaksi yang tidak berikatan, kemudian ditutup menggunakan *cover glass*. Pemeriksaan status akrosom dilakukan menggunakan mikroskop fluoresens (Nikkon, Eclipse E600, Japan) pada panjang gelombang 380-420 nm. Jumlah spermatozoa yang diamati pada setiap perlakuan adalah 200 spermatozoa. Hasil pemeriksaan dengan metode FITC dibedakan ke dalam dua kategori, yaitu spermatozoa dengan akrosom berwarna hijau dikategorikan sebagai akrosom utuh, sementara spermatozoa tidak berwarna hijau dikate-

gorikan sebagai akrosom rusak sesuai metode Cocchia *et al.* (2011). Semua proses pewarnaan dilakukan dalam ruang gelap.

**Teknik Pemeriksaan dengan Metode ABC.** Teknik ABC yang dipakai dalam penelitian ini sesuai dengan metode Hsu *et al.* (1981) dengan beberapa modifikasi. Sampel semen dibuat preparat ulas kemudian dikeringudarkan untuk selanjutnya difiksasi dalam larutan *glutaraldehyde* 4% dan didiamkan pada suhu ruang selama tiga hari. Preparat yang sudah difiksasi kemudian dicuci dengan PBS selama 15 menit serta direndam dengan larutan 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol selama 30 menit untuk menghilangkan peroksidase endogen dan kemudian dicuci kembali dengan PBS.

Preparat diinkubasi dengan lektin PNA (*biotinylated* PNA) (Vector Lab, Inc., USA) selama satu malam. Setelah itu, preparat dicuci dengan PBS. Selanjutnya, pada masing-masing preparat diteteskan ABC kit (*Avidin-Biotin Peroxidase Complex*) (Vector Lab, Inc., USA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit untuk kemudian dicuci dengan PBS. Untuk visualisasi, preparat ditetesi dengan larutan *diamino benzidine* (DAB) (Vector Lab, Inc., USA) dan didiamkan dalam waktu 15 menit. Reaksi yang terjadi ditunjukkan dengan warna coklat pada bagian akrosom yang mengindikasikan akrosom utuh, sementara itu spermatozoa tidak berwarna dikategorikan sebagai akrosom rusak. Jumlah spermatozoa yang diamati pada setiap perlakuan adalah 200 spermatozoa.

### Analisis Data

Data karakteristik spermatozoa serta status akrosom disajikan dalam bentuk persentase dan dianalisis dengan sidik ragam. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan lima kali ulangan. Apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Spermatozoa Domba Selama Proses Pembekuan

Hasil penelitian menunjukkan terjadinya penurunan kualitas spermatozoa selama proses pembekuan (Gambar 1). Motilitas spermatozoa setelah pengenceran ke tahap ekuilibrisasi mengalami penurunan sebesar 12%, dan setelah

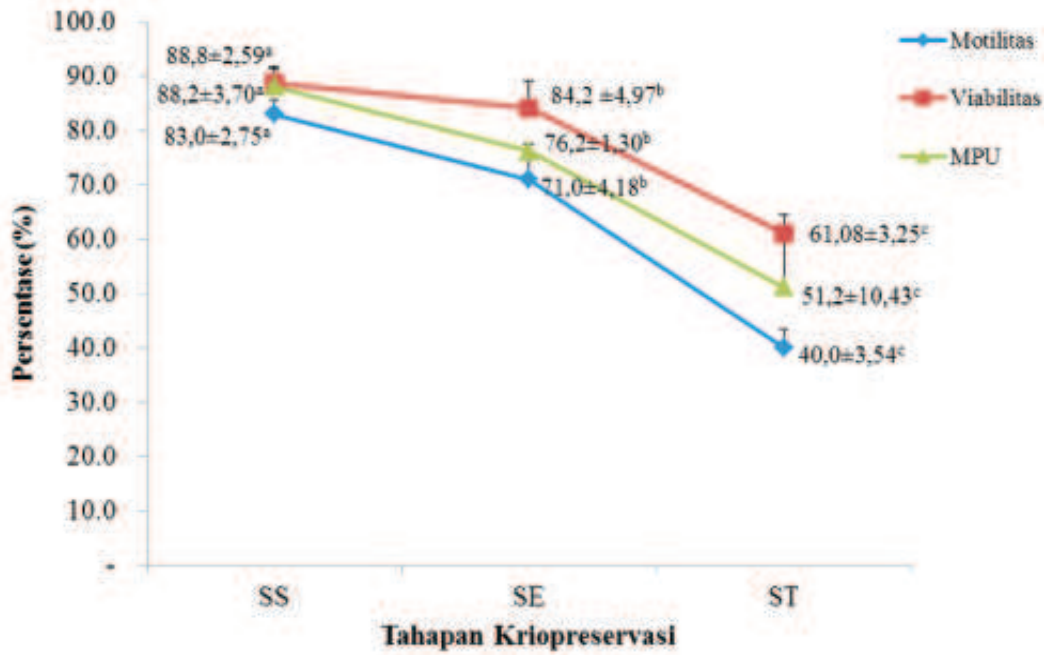
*thawing* sebesar 31%. Dengan demikian, selama proses pembekuan terjadi penurunan persentase motilitas spermatozoa sebesar 43%. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses pembekuan menyebabkan penurunan persentase motilitas spermatozoa yang sangat drastis terutama terjadi saat spermatozoa terpapar oleh nitrogen cair.

Dalam proses pembekuan semen, akibat perlakuan suhu yang sangat rendah (-196°C), terbentuk kristal-kristal es dan perubahan konsentrasi elektrolit intraseluler sehingga menyebabkan kerusakan sel spermatozoa, yang salah satunya ditandai dengan menurunnya motilitas spermatozoa (Hu *et al.*, 2006). Pengaruh pembekuan-*thawing* selain dapat menyebabkan penurunan motilitas juga dilaporkan dapat menyebabkan kerusakan pada organel-organel sel seperti mitokondria spermatozoa (Partyka *et al.*, 2010; Kasai *et al.*, 2002). Energi berupa *adenosine tri phosphate* (ATP) yang merupakan hasil metabolisme di dalam membran mitokondria diduga berperan menggerakkan mikrotubul yang menyebabkan terjadinya pergesekan di antara mikrotubul, sehingga spermatozoa mampu bergerak secara bebas (Silva dan Gadella, 2006).

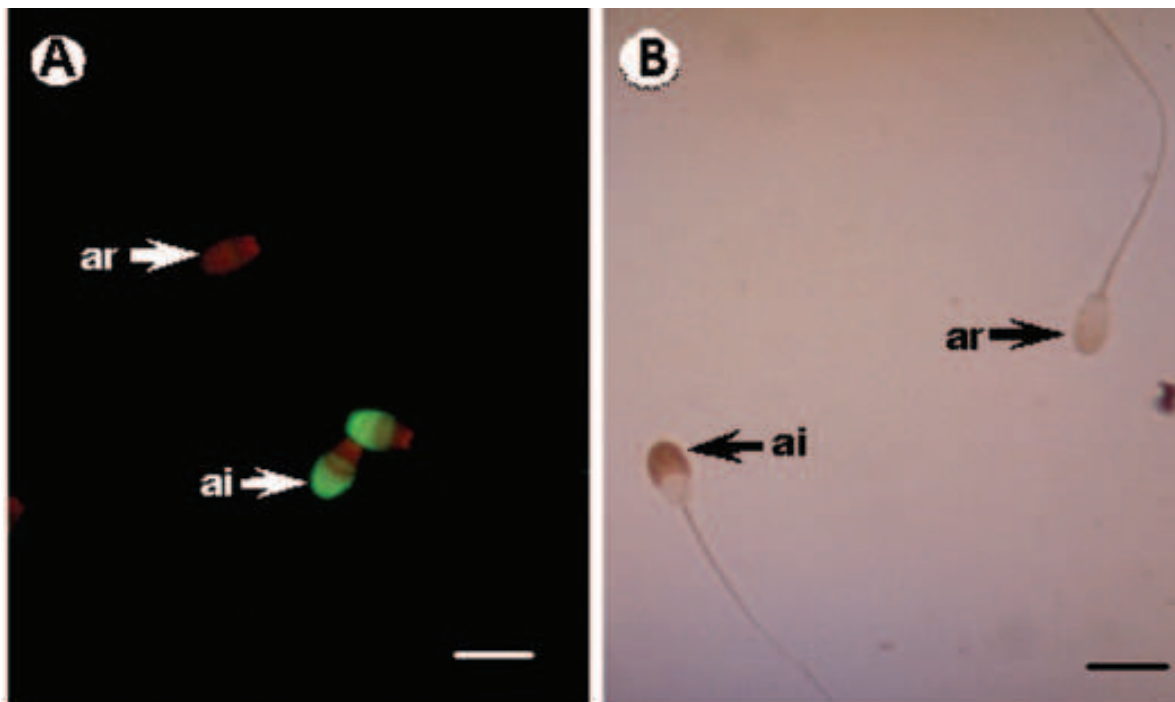
Penurunan viabilitas spermatozoa juga terlihat setelah spermatozoa mengalami proses pembekuan yaitu sebesar 27,72%, meskipun demikian persentase viabilitas spermatozoa setelah *thawing* pada penelitian ini masih memenuhi standar (61,08%), karena menurut Hernandez *et al.* (2012) selama proses pembekuan-*thawing* hampir 50% spermatozoa mati. Tingginya persentase viabilitas spermatozoa pada penelitian ini diduga terkait dengan penggunaan medium NSF I dan NSF II yang mengandung Orvus ES Paste. Komponen aktif pada Orvus ES Paste yaitu *sodium dodecyl sulphate* (SDS) dalam bahan pengencer dapat meningkatkan viabilitas dan fluiditas membran plasma spermatozoa, sehingga dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa setelah *thawing* seperti yang dilaporkan Alhaider dan Watson (2009). Lebih lanjut dilaporkan bahwa Orvus ES Paste mampu meningkatkan daya hidup spermatozoa setelah pencairan kembali (*thawing*) dengan bertindak sebagai surfaktan untuk menstabilkan membran sel dan untuk melindungi spermatozoa dari efek toksik gliserol selama proses pembekuan (Ponglowhapan dan Chatdarong, 2008).

Proses pendinginan pada kriopreservasi spermatozoa dapat menekan aktivitas





Gambar 1 Karakteristik spermatozoa domba selama proses pembekuan. *Superscript* dengan huruf yang berbeda (a, b, c) pada *line* yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). SS = Semen Segar; SE = Setelah Ekuilibrisasi; ST = Setelah *Thawing*; MPU = Membran Plasma Utuh.



Gambar 2 Status akrosom spermatozoa dengan pewarnaan metode FITC (A): Spermatozoa dengan akrosom berwarna hijau dikategorikan sebagai akrosom intact (ai), sedangkan spermatozoa tidak berwarna hijau dikategorikan sebagai akrosom rusak (ar). Status akrosom spermatozoa dengan pewarnaan metode ABC (B): Spermatozoa dengan akrosom berwarna coklat dikategorikan sebagai akrosom intact (ai), sedangkan spermatozoa yang tidak berwarna dikategorikan sebagai akrosom rusak (ar). Skala = 10  $\mu$ m.

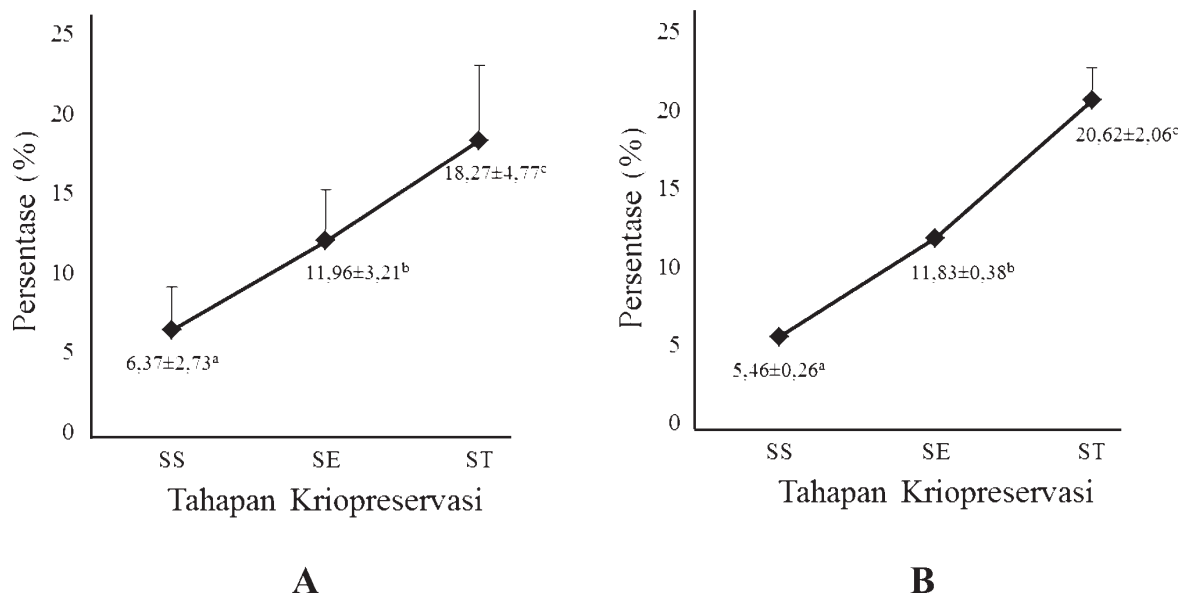
metabolisme dan meningkatkan sensitivitas kejutan dingin yang ditandai dengan penurunan permeabilitas serta integritas membran plasma spermatozoa secara irreversibel yang mengarah kepada gangguan dan kematian spermatozoa (Esteves *et al.*, 2000; Blesbois *et al.*, 2005). Penurunan persentase membran plasma utuh spermatozoa setelah proses pembekuan terjadi penurunan sebesar 37%, sehingga hanya tersisa 51,2% masih memiliki membran plasma utuh. Membran plasma spermatozoa berfungsi untuk pemeliharaan integritas membran dan membentuk permukaan yang dinamis antar sel serta sebagai perlindungan terhadap lingkungan (Zhu dan Liu, 2000). Proses pembekuan-*thawing* dapat menyebabkan kerusakan fungsional membran mencakup peningkatan fluiditas membran dan terjadinya peningkatan tekanan osmotik pada membran yang terjadi ketika sel mengalami dehidrasi ekstrim selama proses pendinginan (Nur *et al.*, 2011). Keadaan ini diperburuk dengan terbentuknya peroksidasi lipid yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi pada membran sel spermatozoa (Gadella, 2008).

**Deteksi Kerusakan Akrosom Spermatozoa Domba**

Keutuhan akrosom merupakan kunci keberhasilan terjadinya proses fertilisasi, karena hanya spermatozoa dengan akrosom utuh yang

mampu menembusi zona pelusida dan melakukan fusi dengan membran plasma oosit (Celeghini *et al.*, 2010). Status akrosom spermatozoa domba selama proses pembekuan pada penelitian ini dideteksi dengan menggunakan dua teknik pewarnaan histokimia lektin yaitu FITC dan ABC (Gambar 2).

Lektin adalah protein, terutama berasal dari tumbuhan, yang tidak memiliki sifat-sifat imunoglobulin tetapi mampu mengenali dan mengikat monosakarida dan oligosakarida. Satu molekul lektin dapat mengikat dua atau lebih molekul-molekul glikoprotein pada permukaan luar sel, seperti *Peanut agglutinin* (PNA) memiliki kekhususan atau spesifitas terhadap residu  $\beta$ -galaktosa (Odhiambo *et al.*, 2011). Molekul lektin yang berikatan tidak melibatkan formasi ikatan kovalen, tetapi lebih mirip dengan perlekatan antigen-antibodi spesifik (Kiernan, 1990). Afinitas lektin terhadap oligosakarida dari glikokonjugat bersifat sangat spesifik (Baker *et al.*, 2004) sehingga interaksi karbohidrat dengan lektin dapat digunakan secara efektif untuk mengevaluasi status akrosom spermatozoa sehingga dapat memberikan gambaran fertilitas dari spermatozoa. Deteksi status akrosom dengan dua metode yang digunakan pada penelitian ini (metode FITC dan ABC) menunjukkan hasil yang sama yaitu terjadi peningkatan persentase akrosom spermatozoa rusak selama proses



Gambar 3 Status akrosom spermatozoa rusak selama proses pembekuan dengan metode FITC (A) dan metode ABC (B). *Superscript* dengan huruf yang berbeda (a, b, c) menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). SS = Semen Segar; SE = Setelah Ekuilibrasi; ST = Setelah *Thawing*.

pembekuan ( $P < 0,05$ ) (Gambar 3). Kenaikan akrosom spermatozoa rusak setelah *thawing* terdeteksi dengan menggunakan metode FITC sebesar 11,9%, sementara dengan metode ABC sebesar 15,16%.

Data hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kenaikan persentase akrosom spermatozoa yang rusak masih dalam batas normal. Hal ini senada dengan Hernandez *et al.* (2012) yang melaporkan bahwa kerusakan akrosom spermatozoa yang terjadi selama proses pembekuan melebihi 50% akan kehilangan kemampuan fertilitasnya. Rendahnya persentase akrosom spermatozoa yang rusak pada penelitian ini diduga terkait dengan kandungan Orvus ES Paste dalam bahan pengencer yang digunakan. Orvus ES Paste dengan komponen aktif *sodium dodecyl sulphate* (SDS) dilaporkan dapat melindungi keutuhan akrosom spermatozoa (Tsutsui *et al.*, 2000) serta membran spermatozoa dalam menjalankan fungsinya mengatur transportasi  $Ca^{2+}$  ekstraselular ke dalam sel selama proses pembekuan (Alhaider dan Watson, 2009). Senyawa SDS merupakan cairan deterjen anionik terlarut yang berperan mempertahankan dan melarutkan membran protein pada konsentrasi tinggi, sehingga dapat meningkatkan kemampuan bertahan spermatozoa selama proses pembekuan secara tidak langsung meskipun mekanismenya secara spesifik belum diketahui (Mizutani *et al.*, 2010). Selain itu, penggunaan SDS bersamaan dengan kuning telur berfungsi mengubah struktur tersier lipoprotein kuning telur dalam media ekstraseluler sehingga keutuhan membran spermatozoa tetap terjaga (Morton *et al.*, 2010).

### SIMPULAN

Status akrosom spermatozoa dapat dideeteksi menggunakan lektin PNA metode FITC dan metode ABC dengan efektifitas yang sama sehingga dapat digunakan untuk penilaian terhadap kualitas dan fertilitas spermatozoa.

### SARAN

Perlu dilakukan uji lapangan untuk pembuktian korelasi hasil penelitian laboratorium dengan tingkat fertilitasnya.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Beasiswa Unggulan Dikti yang telah memberikan dana penelitian. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Teknisi Laboratorium yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agungpriyono S, Kurohmaru M, Kimura J, Wahid AH, Sasaki M, Kitamura N, Yamada J, Fukuta K, Zuki AB. 2009. Distribution of lectin-bindings in the testis of the Lesser Mouse Deer, *Tragulus javanicus*. *Anat Histol Embryol* 38: 208-213.
- Alhaider AK, Watson PF. 2009. Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim Reprod Sci* 110: 147-161.
- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. 2002. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 72: 175-183.
- Baker SS, Thomas M, Thaler CD. 2004. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J Androl* 25(5): 744-751.
- Batista AM, Silva SV, Soares AT, Monteiro Jr PLJ, Wischral A, Guerra MMP. 2011. Comparison of capripure and percoll density gradients for sperm separation of frozen thawed goat spermatozoa. *Anim Reprod* 8: 81-84.
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* 129: 371-378.
- Celeghini ECC, de Andrade AFC, Raphael CF, Nascimento J, Ticianelli JS, de Arruda RP. 2010. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. *Braz Arch Biol Technol* 53(6): 1285-1292.

- Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorizio R, Paraggio G, Mancini A. 2011. Effect of SOD (*superoxide dismutase*) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 75: 1201-1210.
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2000. Improvement in motion characteristic and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Human Reprod* 15: 2173-2179.
- Esteves SC, Verza Jr S. 2011. Relationship of *in vitro* acrosome reaction to sperm function: An Update. *TORSJ* 3: 72-84.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* 52(5-6): 503-510.
- Gadella BM. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci* 107: 229-236.
- Hernandez PJE, Fernandez RF, Rodriguez SJL, Soto MYG, Verona JEH, Garcia RAD. 2012. Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev Salud Anim* 34(2): 84-88.
- Hsu S, Raine L, Fanger, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29(4): 577-580.
- Hu Jian-hong, Li Qing-Wang, Gang-Li, Chen Xiao-Yu, Hai-Yang, Zhang Shu-Shan, Wang Li-Qiang. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *J Anim Sci* 19(4): 486-494.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434: 234-238.
- Karja NWK, Otoi T, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T. 2006. In vitro development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats. *Theriogenology* 65: 415-423.
- Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential. *Asian J Androl* 4: 97-103.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and Histochemical Methods: Theory & Practice* 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Pergamon Press. Hlm. 330-354.
- Kikuchi K, Kashiwazaki N, Nagai T, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. 1999. Reproduction in pigs using frozen-thawed spermatozoa from epididymis stored at 4°C. *J Reprod Dev* 45(5): 345-350.
- Lybaert P, Danguy A, Leleux F, Meuris S, Lebrun P. 2009. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol Histopathol* 24: 999-1007.
- Maji S, Datta U, Hembram ML. 2010. Cell surface changes associated with *in vitro* capacitation and acrosome reaction of goat epididymal sperm by a marine bio-active compound from the snail *Telescopium telescopium*. *Vet Arhiv* 80(5): 561-570.
- Miranda PV, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2009. Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biol Reprod* 80: 897-904.
- Mizutani T, Sumigama S, Nagakubo K, Shimizu N, Oba H, Hori, Tsutsui T. 2010. Usefulness of addition of orvus ES paste and sodium lauryl sulfate to frozen feline semen. *Theriogenology* 72(1): 23-27.
- Morton KM, Evans G, Maxwell WMC. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex-STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74: 311-316.
- Nur Z, Zik B, Ustuner B, Tutuncu S, Sagirkaya H, Ozguden CG, Gunay U, Dogan I. 2011. Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 58: 267-272.



- Odhiambo JF, Sutovsky M, DeJarnette JM, Marshall C, Sutovsky P. 2011. Adaptation of ubiquitin-PNA based sperm quality assay for semen evaluation by a conventional flow cytometer and a dedicated platform for flow cytometric semen analysis. *Theriogenology* 76: 1168-1176.
- Partyka A, Ni-zanski W, Lukaszewicz E. 2010. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology* 74: 1017-1027.
- Partyka A, Lukaszewicz E, Ni-zanski W, Twardon J. 2011. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C<sub>11</sub>-BODIPY. *Theriogenology* 75: 1623-1629.
- Perez-Llano B, Enciso M, Garcia-Casado P, Sala R, Gosalvez J. 2006. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology* 66: 2137-2143.
- Ponglowhapan S, Chatdarong K. 2008. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 69: 666-672.
- Purohit S, Laloraya M, Kumar PG. 2008. Distribution of N- and O-linked oligosaccharides on surface of spermatozoa from normal and infertile subjects. *Andrologia* 40(1): 7-12.
- Schroter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. 1999. The glycocalyx of the sperm surface. *Hum Reprod* 5(4): 302-313.
- Siciliano L, Maeciano V, Carpino A. 2008. Proteosome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol* 6(5): 1-7.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958-978.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. hlm. 112-115.
- Talaei T, Esmaeelpour T, Aekiyash F, Bahmanpour S. 2010. Effects of cryopreservation on plasma membrane glycoconjugates of human spermatozoa. *Iran J Reprod Med* 8(3): 119-124.
- Toshimori K, Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol* 66(5): 383-396.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Ito T, Kawakami E. 2000. Effects of orvus ES paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing. *J Vet Med Sci* 62(5): 533-535.
- Zhu WJ, Liu XG. 2000. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian J Androl* 2: 135-138.