

## Status DNA dan Karakteristik Spermatozoa Kauda Epididimis Domba Pascapenyimpanan pada Suhu 4°C

(DNA STATUS AND CHARACTERISTIC OF SPERM CAUDA EPIDIDYMAL RAM AFTER STORAGE AT 4°C)

Ummul Masir<sup>1</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>1,2</sup>,  
Ni Wayan Kurniani Karja<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,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680 Indonesia,

Telp: (0251) 8626460, Fax: (0251) 8623940

\*Email: karjanwk13@gmail.com

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi status DNA dan karakteristik spermatozoa asal kauda epididimis domba yang disimpan pada suhu 4°C. Sebanyak 12 pasang kauda epididimis domba disimpan dengan cara salah satu dari setiap pasang kauda epididimis dimasukkan ke dalam tabung berisi media (NaCl fisiologis) dan pasangan yang lain ke dalam *ziplock* bersih (tanpa media). Penyimpanan dilakukan selama tiga hari pada suhu 4°C kemudian dilihat motilitas dan viabilitasnya serta status DNA spermatozoa dengan metode *sperm sus halomax*, sebelum dan setelah pembekuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa asal kauda epididimis baik yang disimpan dengan atau tanpa media mengalami penurunan, sebelum atau setelah kriopreservasi ( $P < 0,05$ ). Berdasarkan metode penyimpanan, perbedaan persentase motilitas yang nyata terjadi pada hari ke dua dan ke tiga penyimpanan. Penyimpanan menggunakan media memiliki persentase motilitas yang lebih rendah (23%; 10%) dibandingkan dengan tanpa menggunakan media (50%; 37%) ( $P < 0,05$ ). Status DNA spermatozoa setelah dilakukan penyimpanan pada suhu 4°C selama tiga hari, secara deskriptif memperlihatkan kerusakan DNA spermatozoa kurang dari 1%. Persentase kerusakan kemudian meningkat setelah kriopreservasi spermatozoa akibat dari pembekuan, terutama pada hari ke tiga penyimpanan kauda epididimis dengan media (10,16%). Karakteristik spermatozoa dari kauda epididimis yang disimpan dengan media lebih rendah dibandingkan tanpa media. Status DNA spermatozoa kauda epididimis tidak dipengaruhi oleh metode penyimpanan.

Kata-kata kunci: *Deoxyribonucleic acid*; kauda epididimis; kriopreservasi; preservasi; spermatozoa.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *deoxyribonucleic acid* (DNA) status and characteristics of ram spermatozoa, maintained within epididymides stored at 4°C. A total of 12 pairs of ram cauda epididymis were kept by means that one of the pair in a tube contain media (isotonic NaCl solution) and the other pair into a clean ziplock without medium then stored at 4°C for three days. Following this, the motility and viability and DNA status of spermatozoa was observed using halomax sperm method, prior and post freezing process. The results showed a decreased in the percentage of motility and viability of spermatozoa from cauda epididymis which were kept in and without media, before or after cryopreservation ( $P < 0.05$ ). Based on the storage method, a significant difference in motility percentage occurs at day two and day three of the storage. Storage using media had a lower percentage of motility (23%; 10%) than without using media (50%; 37%) ( $P < 0.05$ ). The DNA status following storage at 4°C for three days, descriptively showed impaired of spermatozoa DNA less than 1%. The percentage of impairment increased following the cryopreservation of spermatozoa due to the freezing process. This condition was especially observed on the third day of storage of cauda epididymis which were kept in media (10.16%). The characteristics of spermatozoa from cauda epididymis which were kept in the media were lower compared to without medium. The DNA status of cauda epididymis spermatozoa is not affected by the storage method.

Keywords: deoxyribonucleic acid; cauda epididymis; cryopreservation; preservation; spermatozoa

## PENDAHULUAN

Sebagai bentuk pelestarian suatu jenis hewan dapat diterapkan metode konservasi sumber daya genetik. Hewan yang terancam punah maupun pejantan unggul merupakan hewan yang perlu dilestarikan materi genetiknya apabila terjadi kematian yang tidak terduga seperti perburuan liar ataupun serangan penyakit. Salah satu metode dalam pelestarian gamet jantan melalui pengambilan spermatozoa bagian distal epididimis (kauda epididimis) sesaat hewan tersebut mati. Kaabi *et al.* (2003) melaporkan, spermatozoa yang berada pada kauda epididimis sudah dalam keadaan motil dan matang dengan kemampuan motilitas bergerak maju ke depan dan kemampuan fertilisasi sama dengan spermatozoa dari ejakulat. Setelah hewan mati, spermatozoa dalam epididimis masih dapat bertahan hidup untuk periode waktu tertentu (Martinez-Pastor *et al.*, 2005; Ganan *et al.*, 2009; Malcotti *et al.*, 2012). Kematian hewan yang pada umumnya tidak terduga serta minimnya keberadaan laboratorium dan teknisi menjadi kendala di lapangan untuk dapat segera memproses spermatozoanya. Dengan demikian dibutuhkan sebuah metode penyimpanan (preservasi) yang tepat ketika testis tidak dapat ditangani dengan segera guna mempertahankan viabilitas spermatozoa. Salah satu metode yang telah digunakan berupa preservasi kauda epididimis pada 4°C.

Spermatozoa masih bisa dikoleksi dari kauda epididimis yang telah disimpan pada suhu 4°C, spermatozoa akan mengalami penurunan kualitas seperti motilitas dan viabilitas (Karja *et al.*, 2013). Menurut Gadea *et al.* (2011) proses dari *freezing* dan *cooling* akan berpengaruh terhadap kepadatan kromatin spermatozoa. Lebih lanjut Vieira *et al.* (2013) menambahkan bahwa adanya pengaruh terhadap kepadatan kromatin terjadi di fase pertama prosedur pembekuan. Spermatozoa yang terpapar pada suhu ekstrim seperti yang dilaporkan Sali (2006) yang melakukan pengeringbekuan spermatozoa yang diawali dengan pemaparan pada suhu -196°C menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan akrosom, bahkan berpotensi dapat mengubah integritas kromatin dan DNA spermatozoa.

Keberhasilan pembuahan oleh spermatozoa terhadap ovum baik melalui teknik inseminasi buatan (IB) ataupun teknologi produksi embrio *in vitro*, diperlukan spermatozoa dengan DNA

yang utuh (*intact*). Senyawa DNA spermatozoa diketahui mempunyai kontribusi terhadap setengah dari material genom pada keturunan yang dihasilkan. Materi genetik dari spermatozoa yang normal diperlukan untuk mendukung terjadinya fertilisasi, perkembangan embrio, perkembangan fetus, dan keturunan yang normal (Agarwal dan Allamaneni, 2004). Abnormalitas pada DNA spermatozoa akan menghambat perkembangan embrio, menurunkan kemampuan implantasi sehingga mengakibatkan gagalnya kebuntingan (Seli *et al.*, 2004). Evenson *et al.* (2000) menambahkan bahwa spermatozoa yang memiliki kerusakan DNA lebih dari 30% mengakibatkan kegagalan terjadinya kebuntingan. Spermatozoa dengan kerusakan DNA dapat berkondensasi setelah masuk ke dalam sitoplasma ovum, akan tetapi fertilisasi mungkin tidak terjadi atau akan terjadi kegagalan pascafertilisasi (Agarwal dan Allamaneni, 2004). Pada manusia dilaporkan bahwa keberhasilan program bayi tabung dihubungkan dengan kerusakan DNA pada spermatozoa (Spano *et al.*, 2000). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk melihat status DNA spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis yang dipreservasi pada suhu 4°C selama tiga hari penyimpanan.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan spermatozoa yang dikoleksi dari 12 pasang kauda epididimis yang berasal dari domba jantan umur dua tahun. Kauda epididimis diambil dari Rumah Potong Aqiqah Desa Cikarawang, Kecamatan Dramaga, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

### Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk menyimpan kauda epididimis domba pada suhu 4°C adalah NaCl fisiologis 0,9% yang ditambahkan 0,06 IU/L *penicillin* (Sigma-Aldrich. Inc, P-4687) dan 0,1 mg/mL *streptomycin* (Sigma-Aldrich. Inc, S-9137).

### Koleksi Kauda Epididimis dan Spermatozoa

Testis diperoleh dari domba jantan berumur lebih dari dua tahun sesaat setelah disembelih di rumah potong. Kauda epididimis kemudian dipisahkan dari testis. Satu dari setiap pasang kauda epididimis dimasukkan ke dalam tabung (*centrifuge tube* 15 mL) yang berisi media dan

pasangannya dimasukkan ke dalam plastik *ziplock* tanpa media. Seluruh sampel disimpan dalam kotak *sterofoam* untuk dibawa ke laboratorium. Kauda epididimis yang disimpan dalam *ziplock* dan tabung dibagi dalam empat kelompok. Sebagai sampel kontrol (H0), diambil satu pasang kauda epididimis dari masing-masing metode penyimpanan kemudian segera dilakukan pengoleksian dan pengamatan spermatozoanya, sedangkan sampel yang lain dimasukkan ke dalam kulkas pada suhu 4°C dan dibagi berdasarkan kelompok lama penyimpanan satu hari (H1), dua hari (H2), dan tiga hari (H3). Setelah penyimpanan, sampel ditempatkan dalam cawan petri yang berbeda. Spermatozoa dikoleksi dengan cara kauda epididimis disayat sambil dibilas dengan pengencer *Niwa and Sasaki Freezing-I* (NSF-I) hingga spermatozoa keluar, lalu dihomogenkan dengan pengencer dan didiamkan selama tiga menit. Pengamatan dilakukan terhadap persentase motilitas, viabilitas, status DNA, dan dilanjutkan dengan proses kriopreservasi.

#### Persiapan Bahan Pengencer

Komposisi bahan pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengencer Niwa dan Sasaki *Freezing* (NSF) (Kikuchi *et al.*, 1998) untuk kriopreservasi spermatozoa dari kauda epididimis. Pada proses kriopreservasi, penambahan bahan pengencer dilakukan dengan metode *two-step freezing*. 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 (PT. Meiji Indonesian, Batch no. PAL. 09654), 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 (Merck, Germany).

#### Kriopreservasi Semen

Metode pembekuan spermatozoa yang digunakan berdasarkan metode yang digunakan dalam Karja *et al.* (2013) dengan menggunakan dua tahap penambahan pengencer. Pada tahap awal, spermatozoa yang telah dikoleksi dihomogenkan dengan NSF-I dalam tabung kemudian diekuilibrasikan pada suhu 4°C selama dua jam. Dilanjutkan pada tahap ke dua yaitu penambahan NSF-II ke dalam tabung kemudian diekuilibrasikan selama lima menit pada suhu yang sama. Perbandingan penambahan medium NSF-I dengan NSF-II sebesar 1:1 dengan konsentrasi akhir spermatozoa setelah penambahan NSF sebesar 10<sup>8</sup> spermatozoa/mL dan

konsentrasi akhir gliserol sebesar 3%. Spermatozoa kemudian dikemas pada *straw* berukuran 0,25 mL lalu dicelupkan/dicemplungkan ke dalam nitrogen cair selama 20 menit dilanjutkan dengan menyimpan *straw* beku ke dalam kontainer. Untuk proses evaluasi, spermatozoa beku diambil kemudian *dithawing* dalam penangas air pada suhu 37°C selama 30 detik. Segera *straw* diangkat lalu dilakukan evaluasi karakteristik spermatozoa dan status DNA.

#### Parameter Evaluasi Karakteristik Spermatozoa

**Penilaian Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa.** Motilitas spermatozoa diamati di bawah mikroskop cahaya secara subjektif. Selanjutnya, penilaian viabilitas ditentukan dengan menggunakan metode pewarnaan eosin negrosin. Spermatozoa yang terwarnai (merah) dikategorikan sebagai spermatozoa yang mati, sedangkan spermatozoa yang tidak terwarnai (putih) dikategorikan spermatozoa yang hidup. Pengamatan dilakukan terhadap 200 spermatozoa pada 5-10 lapang pandang.

**Pengujian Status DNA.** Pengujian status DNA dilakukan dengan menggunakan teknik modifikasi *sperm chromatin dispersion* (SCD) sesuai dengan metode yang diterapkan oleh (Fernandez *et al.*, 2003). Sampel spermatozoa yang diamati diencerkan hingga konsentrasi akhir 5-10x10<sup>6</sup>/mL dalam NaCl 0,9%. Agarose lalu dilelehkan dalam penangas air 90-100°C selama lima menit, kemudian diinkubasi pada penangas air suhu 37°C selama lima menit. Sebanyak 25 µL semen dimasukkan ke dalam tabung berisi agarose (*mixing*) lalu diteteskan ke *slide* sebanyak 25 µL kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diinkubasikan selama lima menit. *Cover glass* dilepas perlahan kemudian *slide* diteteskan dengan *lysis solution* (LS) hingga permukaan *slide* tertutup rata oleh LS, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama lima menit. Selanjutnya, preparat diinkubasi dalam aquades selama lima menit. Setelah itu preparat diinkubasikan dalam nampan berisi etanol 70%, 90%, dan 100% masing-masing dalam waktu empat menit, kemudian preparat dikeringkan.

**Pewarnaan Preparat.** Preparat diinkubasi dalam nampan berisi pewarna eosin selama lima menit, kemudian dicuci menggunakan aquades selama dua menit. Setelah itu diinkubasikan di dalam nampan inkubator berisi *methylen blue* selama lima menit, kemudian dicuci dengan aquades dalam nampan

selama dua menit, lalu dikering anginkan. *Slide* yang telah kering, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan 200 spermatozoa dilakukan terhadap setiap sampel. Spermatozoa yang memiliki *halo* di bagian tepi kepala diidentifikasi memiliki kerusakan DNA, sedangkan spermatozoa tanpa *halo* diidentifikasi sebagai spermatozoa dalam keadaan normal. *Halo* merupakan warna yang muncul di sekitar perifer kepala spermatozoa akibat dari lisis protein.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Karakteristik Spermatozoa Asal Kauda Epididimis Setelah Penyimpanan 4°C**

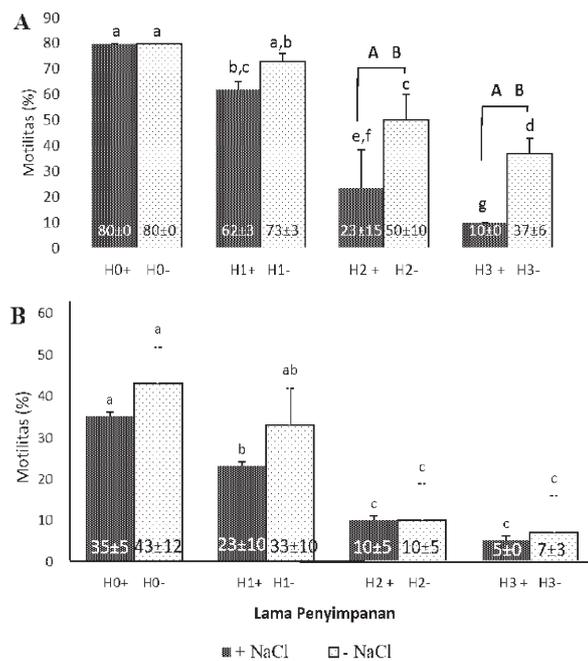
Hasil penelitian menunjukkan pengaruh penyimpanan spermatozoa dalam kauda epididimis pada suhu 4°C mengalami penurunan persentase motilitas dan viabilitas seiring bertambahnya waktu penyimpanan ( $P < 0,05$ ) (Gambar 1A). Berdasarkan persentase motilitas spermatozoa, kauda epididimis saat memasuki hari ke dua dan ke tiga penyimpanan dengan menggunakan media memperlihatkan nilai yang lebih rendah (23%; 10%) dibanding dengan yang disimpan tanpa media (50%; 37%) ( $P < 0,05$ ). Data tersebut mengindikasikan bahwa penggunaan NaCl tidak memberikan pengaruh yang lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa ( $P < 0,01$ ) daripada tanpa media.

Sankai *et al.* (2001) melaporkan bahwa motilitas spermatozoa mengalami penurunan ketika disimpan pada suhu 15-20°C akibat perubahan aktivitas metabolisme spermatozoa. Penyimpanan spermatozoa dalam epididimis berpengaruh terhadap morfologi ekor spermatozoa (bengkok) karena terjadi pengerasan phospholipid pada membran plasma akibat paparan pada suhu 5°C.

Motilitas spermatozoa setelah dikriopreservasi (*post thawing*) (Gambar 1B) mengalami penurunan pada hari ke dua dan ke tiga penyimpanan ( $P < 0,05$ ). Kauda epididimis yang disimpan tanpa media (33%) memiliki motilitas spermatozoa yang masih bisa dipertahankan kualitasnya sama dengan hari kontrol (43%) meski telah disimpan sehari ( $P < 0,05$ ). Selanjutnya, kauda epididimis yang disimpan dengan NaCl tidak mampu mempertahankan motilitasnya (23%) sama dengan hari kontrol (35%) ( $P < 0,05$ ).

Viabilitas spermatozoa kauda epididimis

yang disimpan pada suhu 4°C (Gambar 2A) tanpa menggunakan media dapat mempertahankan nilai viabilitasnya sama seperti pada hari kontrol (96%) ( $P < 0,05$ ) meskipun penyimpanan diperpanjang hingga tiga hari. Lebih lanjut, viabilitas spermatozoa dari kauda epididimis yang disimpan dengan media mengalami penurunan (86%) ( $P < 0,05$ ) setelah satu hari penyimpanan yang kemudian dipertahankan hingga hari ke tiga penyimpanan. Spermatozoa hasil kriopreservasi (Gambar 2B) memiliki nilai viabilitas yang mampu dipertahankan sama dengan hari kontrol meskipun kauda epididimis telah disimpan selama satu hari baik dengan atau tanpa media (40%; 43%) ( $P < 0,05$ ) kemudian viabilitas tersebut menurun saat memasuki hari ke dua penyimpanan (38%). Kauda epididimis yang disimpan dengan media memiliki viabilitas spermatozoa yang menurun pada hari ke tiga (12%) ( $P < 0,05$ ).



Gambar 1. Motilitas spermatozoa kauda epididimis pascapenyimpanan kauda epididimis selama tiga hari dengan (+) dan tanpa (-) media sebelum (A) dan sesudah (B) dikriopreservasi. Huruf yang berbeda (a-g) menunjukkan perbedaan pada bar yang sama di antara lama penyimpanan ( $P < 0,05$ ). Bar dengan huruf (A,B) menunjukkan perbedaan pada kelompok hari dengan lama penyimpanan yang sama ( $P < 0,05$ ).

Salah satu metode yang dapat digunakan dalam mempertahankan kualitas spermatozoa dalam jangka waktu yang panjang yaitu kriopreservasi spermatozoa pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Perubahan suhu ekstrim yang diakhiri dengan *thawing* suhu  $37^{\circ}\text{C}$  memberikan pengaruh terhadap karakteristik spermatozoa. Secara fisiologis, epididimis dalam tubuh hewan hidup menyediakan suasana lingkungan yang sesuai dengan keadaan spermatozoa sehingga mampu mempertahankan metabolisme dan mencegah terjadinya aktivasi prematur spermatozoa (Sostaric *et al.*, 2008).

Penggunaan media NaCl fisiologis selama penyimpanan tidak menunjukkan atau memberikan hasil yang lebih baik daripada kualitas spermatozoa kauda epididimis yang disimpan tanpa media. Sankai *et al.* (2001) menyatakan bahwa penggunaan media penyimpanan epididimis berbahan dasar cairan, mengakibatkan cairan tersebut masuk

menembus epididimis kemudian meningkatkan aktivitas metabolisme spermatozoa selama penyimpanan dilakukan. Proses autolisis dalam kauda epididimis berpengaruh juga terhadap motilitas spermatozoa, karena setelah 24 jam penyimpanan mengakibatkan penurunan motilitas, namun tidak pada viabilitas spermatozoa (Tittarelli *et al.*, 2006). Setelah kematian hewan, kauda epididimis mengalami hipoksia yang menyebabkan penurunan ATP, sehingga pompa sodium potasium terganggu. Ion sodium masuk ke dalam sel dan ion potasium ke luar sel (Myres *et al.*, 2012).

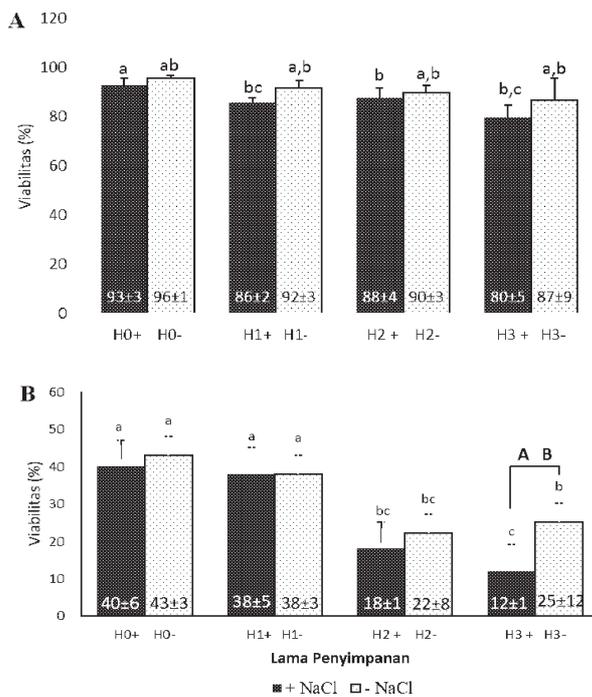
Metode penyimpanan kauda epididimis dengan menggunakan media (NaCl fisiologis) pada penelitian ini memberikan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tanpa media. Hal ini diduga karena setelah kematian hewan mengalami hipoksia jaringan. Gangguan pada pompa sodium potasium mengakibatkan peningkatan tekanan osmotik sehingga air berpindah secara pasif ke intraseleuler melalui plasma membran sehingga sel menjadi bengkak (Myres *et al.*, 2012). Lebih lanjut, menurut Bishopric *et al.* (1999) asidosis dan kondisi hipoksia berpengaruh kuat dalam kematian sel. Kualitas spermatozoa pascapembekuan mengalami penurunan sebagai akibat dari faktor pembekuan.

Penurunan kualitas spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis disebabkan karena pada cairan epididimis tidak tersedia glikoprotein seperti yang disintesis oleh kelenjar vesikular. Glikoprotein dapat berfungsi sebagai pelindung membran plasma spermatozoa dari pengaruh cekaman dingin dan serangan radikal bebas dari kontak spermatozoa dengan  $\text{O}_2$  pada saat proses pengoleksian spermatozoa (Rizal, 2005).

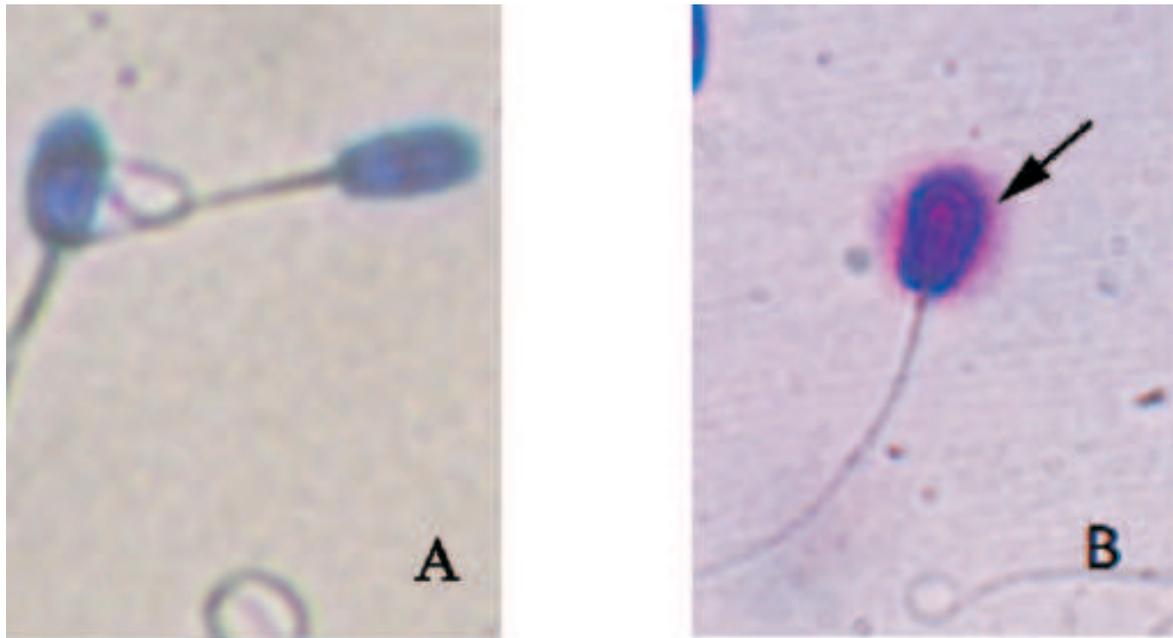
**Status DNA Spermatozoa Asal Kauda Epididimis Setelah Penyimpanan  $4^{\circ}\text{C}$**

Status DNA spermatozoa ditentukan oleh keberadaan kromatin dalam inti sel yang berikatan erat pada protamin sebagai pelindung DNA inti. Spermatozoa yang menghasilkan *halo* di bagian tepi kepala diidentifikasi sebagai spermatozoa yang memiliki kerusakan DNA (tidak utuh) (Gambar 3), sedangkan kepala spermatozoa yang tidak terdapat *halo* masih memiliki DNA yang utuh.

Berdasarkan penilaian secara deskriptif terhadap status DNA spermatozoa setelah dilakukan penyimpanan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  (sebelum kriopreservasi), secara keseluruhan



Gambar 2. Viabilitas spermatozoa kauda epididimis pascapenyimpanan kauda epididimis selama tiga hari dengan (+) dan tanpa (-) media sebelum (A) dan sesudah (B) dikriopreservasi. Huruf yang berbeda (a-c) menunjukkan perbedaan pada bar yang sama di antara lama penyimpanan ( $P<0,05$ ). Bar dengan huruf (A,B) menunjukkan perbedaan pada kelompok hari dengan lama penyimpanan yang sama ( $P<0,05$ ).



Gambar 3. Status DNA spermatozoa setelah diwarnai melalui teknik sperm sus halomax dengan kepala spermatozoa yang tidak terbentuk halo menunjukkan status DNA yang utuh (*intact*) (A). Kepala spermatozoa yang terbentuk halo menunjukkan status DNA yang tidak utuh (tidak *intact*) (B).

Tabel 1. Status Kerusakan DNA spermatozoa domba sebelum dan setelah kriopreservasi

NaCl	Lama Penyimpanan (hari)	Status DNA (%)	
		Sebelum Kriopreservasi	Setelah Kriopreservasi
(-) NaCl	H0 (kontrol)	0,17	0,17
	H1	0	1,17
	H2	0,17	2,00
	H3	0,17	1,83
(+) NaCl	H0	0,17	0,17
	H1	0	1
	H2	0	1,83
	H3	0,67	10,17

Keterangan : H0, H1, H2, dan H3= Penyimpanan kauda epididimis selama 0,1,2 dan 3 hari. (+) dan (-) = Perlakuan epididimis menggunakan NaCl dan tanpa NaCl.

memperlihatkan tingkat kerusakan DNA kurang dari 1% (Tabel 1). Setelah kriopreservasi, terjadi peningkatan kerusakan DNA akibat proses kriopreservasi terutama pada hari ke tiga penyimpanan kauda epididimis dengan media (10,17%).

Kauda epididimis yang disimpan tanpa menggunakan media pada suhu 4°C (sebelum kriopreservasi) ditemukan kerusakan DNA spermatozoa dengan kisaran 0,00–0,17%, se-

dangkan dengan media NaCl mengalami kerusakan DNA dengan rentang 0,00–0,67%. Data tersebut menunjukkan bahwa penggunaan media NaCl dalam penyimpanan kauda epididimis tidak memberikan efektivitas yang lebih baik dalam mempertahankan integritas DNA. Setelah dilakukan kriopreservasi terjadi peningkatan kerusakan DNA dari 0,17 menjadi 1,83%.

Spermatozoa memiliki kromatin dengan protein yang berikatan kuat sehingga mampu

menjaga ketahanan DNA spermatozoa pada suhu yang rendah. Kromatin inti spermatozoa mengandung DNA yang kompleks dengan protein dasar protamin yang kaya akan arginin dan sistein (Curry dan Watson, 1995). Fuentes-Mascorro *et al.* (2000) menambahkan bahwa protamin memiliki setengah dari ukuran histon yaitu 5-8 kDa. Residu asam amino protamin berupa arginin sebanyak 55 sampai 79%.

Gugus thiol (sistein) pada protamin, akan teroksidasi hingga membentuk ikatan disulfida (SS) sehingga inti spermatozoa menjadi sangat kompak. Hal ini memungkinkan spermatozoa dapat mencegah terjadinya kerusakan DNA. Tidak seperti kebanyakan hewan pada umumnya, kromatin spermatozoa pada mamalia berbeda dengan sel tubuh baik dari segi struktur maupun komposisinya. Struktur kromatin spermatozoa berfungsi untuk melindungi integritas selama transportasi pada saat genome paternal pada proses ejakulasi. Senyawa DNA spermatozoa tersusun dari protein yang padat sehingga ukurannya menjadi kecil (Ward dan Coffey, 1991). Sampai saat ini belum ada standar kerusakan DNA sebagai penilaian keutuhan DNA pada spermatozoa.

### SIMPULAN

Karakteristik spermatozoa kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4°C menurun seiring bertambahnya periode penyimpanan. Penggunaan media NaCl fisiologis sebagai media penyimpanan kauda epididimis tidak memberikan pengaruh yang lebih baik bahkan lebih rendah dalam memertahankan kualitas spermatozoa. Lebih lanjut, terdapat kerusakan DNA spermatozoa sebesar <1% dan meningkat setelah dilakukan kriopreservasi menjadi 10,17%.

### SARAN

Pada penelitian selanjutnya, preservasi kauda epididimis dapat dilakukan pada suhu 4°C meskipun tanpa menggunakan media penyimpanan NaCl fisiologis.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Studi dan penelitian ini dibiayai dari beasiswa Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi melalui program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana dalam Negeri (BPPDN) tahun 2013 sampai 2015 dan sebagian penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi IPB Tahun Anggaran 2014.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Allamaneni S. 2004. Role of free radicals in female reproductive disease and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 9(3): 338-347.
- Bishopric NH, Discher DJ, Kaiser S, Hernandez O, Sato B, Zang J, Webster KA. 1999. Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J Clin Invest* 104(3): 239.
- Curry M, Watson P. 1995. Sperm structure and function. Dalam: *Gametes The Spermatozoon*. Cambridge (GB): Cambridge Univ Press. Hlm. 45-69.
- Evenson D, Jost L, Corzett M, Balhorn R. 2000. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: case study. *J Androl* 21(5): 739-746.
- Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24(1): 59-66.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. 2000. Sperm chromatin. *Arch Androl* 45(3): 215-225.
- Gadea J, Molla M, Selles E, Marco M, Garcia-Vazquez F, Gardon J. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62: 40-46.

- Ganan N, Gomendio M, Roldan E. 2009. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology* 72(9): 1268-1277.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraez P, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60: 1249–1259.
- Karja NW, Fahrudin M, Setiadi M. 2013. In vitro fertility of post-thawed epididymal ram spermatozoa after storage at 5°C before cryopreservation. *Media Peternakan* 36(1): 26-31.
- Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 50(4): 615-623.
- Malcotti V, Pelufo V, Bergamo N, Aisen E. 2012. Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing–thawing. *Anim Reprod Sci* 52(8): 741-745.
- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Diaz A, Anel E, Herraez P, De Paz P, Anel L. 2005. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on post-mortem time. *Theriogenology* 63(1): 24-40.
- Myers RK, Gavin MDM, Zacbary JF. 2012. Cellular Adaptation, Injury, and Death: Morphologic, Biochemist, and Genetic Disease. Dalam: Zacbary JF, Gavin MDM (Editor). *Pathologic Basis of Veterinary Disease Fifth Edition*. Missouri (US): Elsevier. Hlm. 2-49.
- Rizal M. 2005. Fertilitas spermatozoa ejakulat dan epididimis domba garut hasil kriopreservasi menggunakan modifikasi pengencer tris dengan berbagai kroprotektan dan antioksidan [*Disertasi*]. Bogor (ID). Institut Pertanian Bogor.
- Saili T. 2006. Morfologi dan integritas DNA spermatozoa domba setelah diawetkan dengan metode pengeringbekuan [*Disertasi*]. Bogor (ID). Institut Pertanian Bogor
- Sankai T, Tsuchiya H, Ogonuki N. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55(8): 1759-1768.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. 2004. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 82(2): 378-383.
- Sostaric E, Aalberts M, Gadella B, Stout TA. 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 107(3): 237-248.
- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and Sterility* 73(1): 43-50.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 66(6): 1637-1640.
- Vieira L, Gadea J, Garcia-Vazquez F, Aviles-Lopez K, Matas C. 2013. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Theriogenology* 136: 280-288.
- Ward W, Coffey D. 1991. Minireview DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44: 569-574.