

Kajian Aglutinasi Spermatozoa Melalui Karakterisasi Plasma yang Dikoleksi dari Epididimis dan Seminalis Domba

(STUDY ON SPERM AGGLUTINATION WITH CHARACTERIZATION
OF PLASMA COLLECTED FROM EPIDIDYMIS AND EJACULATE IN RAM)

¹Muhammad Haviz, ²Arief Boediono, ³M Agus Setiadi,
⁴Srihadi Agungpriyono, ²Mokhamad Fahrudin.

¹ Program Studi Biologi Sekolah Tinggi Keguruan Ilmu Pendidikan Persatuan Guru
Republik Indonesia (STKIP PGRI) Padang,

Jl. Gunung Pangilun, Padang, Sumatera Barat, 25142.

Telp.0751-7053731, Fax. 0751-7058302. E-mail:haviz80@yahoo.co.id

² Lab. Embriologi, ³ Lab. IVF-Reproduksi dan Kebidanan, ⁴ Lab. Histologi,
Fakultas Kedokteran Hewan,

Institut Pertanian Bogor, Jln Agatis, Dramaga, Bogor 16680

ABSTRACT

This study was designed to optimize the use of epididymal or ejaculate sperm and plasma for *in vitro* fertilization, that sperm agglutination was found at preparation. The rate of sperm agglutination was calculated the head-to-head sperm agglutination that were incubated in Krebs Ringer-(N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) or KR-HEPES medium in 38.5°C with 5% CO₂ at 1, 3, 5 and 7 hours culture *in vitro*. The rate of head-to-head sperm agglutination were decreased with time treatments. The cauda of sperm agglutination was lower than that caput, corpus epididymal and ejaculate sperm with statistically significant (P<0.01). These result reflected that distribution of anti-agglutinin might be higher in cauda epididymal than that other areas. Number of protein were characterized with SDS-PAGE as follow 11 bands in caput epididymal, 9 bands in corpus epididymal, 2 bands in cauda epididymal and 4 bands in seminal plasma. The higher distribution of protein was found at range 25-40 kDa in epididymal plasma of ram. However, further investigation should be conducted to determine presumptive anti-agglutinin by advance method.

Key words: head-to-head sperm agglutination, cauda epididymal plasma

PENDAHULUAN

Upaya peningkatan populasi ternak dengan menerapkan teknologi reproduksi mutakhir, khususnya fertilisasi *in vitro*, belum dilakukan secara optimal (Boediono *et al.*, 2000; Djuwita *et al.*, 1998). Karena itu, perlu upaya untuk meningkatkan tingkat keberhasilan fertilisasi *in vitro*. Dalam fertilisasi *in vitro*, spermatozoa biasanya diambil langsung dari epididimis atau dari ejakulat yang ditampung menggunakan vagina buatan. Kedua cara ini dapat dilakukan dengan mudah dan murah. Misalnya, pengambilan spermatozoa dari epididimis dapat dilakukan dengan memanfaatkan limbah rumah potong hewan, sedangkan penampungan ejakulat dengan bantuan vagina buatan juga menggunakan teknik sederhana dan mudah (Rizal *et al.*, 2004). Namun, keduanya sering

mengabaikan cairan plasmanya yang berperan amat penting sebagai media untuk menjaga kehidupan spermatozoa.

Untuk menjaga kehidupannya saat dipakai dalam proses fertilisasi *in vitro*, spermatozoa biasanya diinkubasi dalam media tertentu sehingga kehidupan, daya tahan, dan kapasitasnya terjaga sebelum diinkubasikan bersama dengan sel telur (Boediono *et al.*, 2000a). Secara alami, spermatozoa yang dibiarkan dalam media tertentu akan mengalami proses aglutinasi atau penggumpalan. Secara tidak langsung, proses aglutinasi akan menurunkan tingkat efisiensi spermatozoa dalam membuahi sel telur. Penambahan heparin pada medium inkubasi (Thundathil *et al.*, 1998) dilaporkan dapat meningkatkan kapasitas spermatozoa untuk membuahi sel telur dan mengurangi tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa untuk

membuahi sel telur. Namun, ada yang melaporkan bahwa spesies hewan berpengaruh terhadap efisiensi penggunaan heparin untuk meningkatkan efisiensi atau kualitas spermatozoa. Selain itu, mekanisme kerja heparin belum diketahui secara jelas, apakah senyawa ini khusus menghambat reaksi aglutinin atau menghambat kerja semua jenis protein pada akrosom spermatozoa. Jika kerjanya menghambat semua jenis protein, maka heparin juga akan mengganggu kerja protein pengikat pada zona pellusida dari ovum. Dengan demikian, diperlukan cara khusus untuk menghambat kerja protein aglutinin sehingga tidak mengganggu kerja protein lainnya. Penghambatan aglutinasi tampaknya dapat dilakukan dengan antiaglutinin.

Salah satu sumber antiaglutinin adalah plasma epididimis (Harayama *et al.*, 1994). Untuk mendeteksi keberadaan antiaglutinin, bisa digunakan teknik instrumentasi. Karakterisasi dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Harayama *et al.*, (1995, 1999) telah mengkarakterisasi dan mengidentifikasi antiaglutinin yang dikoleksi dari epididimis babi. Protein ini mempunyai berat molekul 25 kDa, disekresikan oleh sel-sel epitel lumen korpus dan dialirkan ke kauda epididimis, sehingga protein antiaglutinin ini diikat di akrosom spermatozoa (Harayama *et al.*, 1994), dan sel-sel epitel epididimis aktif mensekresikan cairan yang dibutuhkan untuk spermatozoa selama berada di epididimis (Okamura *et al.* 1992). Protein tersebut juga mampu mengurangi dan menghambat terjadinya aglutinasi antarkepala spermatozoa babi (Harayama *et al.*, 1994). Dengan menggunakan teknik serupa, karakterisasi plasma yang dikoleksi dari *epididymis* dan ejakulat dari domba diharapkan dapat dilakukan, sehingga dapat digunakan untuk meningkatkan kapasitas spermatozoa dalam fertilisasi *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Koleksi Plasma Kaput Epididimis, Korpus Epididimis, Kauda Epididimis, dan Seminalis

Epididimis domba diseleksi dan dikoleksi dari rumah potong hewan tradisional, kemudian dibawa ke laboratorium untuk diambil cairan dari bagian kaput, korpus, dan cauda dengan menggunakan spuit. Ejakulat domba diperoleh dengan cara menampung dengan bantuan vagina buatan. Untuk memperoleh supernatan,

ke-empat sampel dimasukkan ke dalam tabung terpisah berukuran 1,5 ml dan disentrifus (Kokusan H-26F Corp. Tokyo, Japan) pada kecepatan 700 g (untuk epididimis) dan 500 g (untuk ejakulat) selama 5 menit pada suhu ruang.

Selanjutnya, untuk memperoleh plasma, keempat jenis supernatan yang diperoleh disentrifus (Kokusan H-1500DR Corp. Tokyo, Japan) kembali dengan kecepatan 10.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya, keempat jenis plasma disimpan sementara dalam refrigerator bersuhu 4°C sebagai stok, yang akan digunakan pada kegiatan karakterisasi protein plasma epididymis dan ejakulat.

Sebaran Antiaglutinin dengan Kajian Aglutinasi Spermatozoa

Penelitian ini bertujuan menentukan keberadaan dan sebaran antiaglutinin di daerah kaput, korpus, kauda epididimis, dan ejakulat berdasarkan tingkat aglutinasi spermatozoa. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola faktorial dengan 4 perlakuan yang diulang sebanyak 5 kali. Sebaran antiaglutinin masing-masing daerah tersebut ditentukan dengan melihat tingkat aglutinasi spermatozoa yang diinkubasi secara *in vitro* pada periode 1, 3, 5, dan 7 jam.

Cairan kaput, korpus, kauda epididimis dan ejakulat yang diperoleh dicampurkan dengan medium Krebs Ringer-HEPES (KR-HEPES) 1:50 di dalam tabung berukuran 1,5 ml. Tabung-tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C. Masing-masing setelah 1, 3, 5, dan 7 jam, campuran tersebut diambil 10 µl dengan mikropipet untuk dibuat preparat ulas pada gelas objek berukuran 76,2x5,4x1,2 mm. Selanjutnya, preparat difiksasi dengan glutaraldehid 0,25% dalam NaCl Fisiologis (1:1), dikeringanginkan dan diwarnai dengan Giemsa 10% (Merck, Darmstadt Germany). Untuk memperoleh data berupa frekuensi aglutinasi, dilakukan penghitungan semua aglutinasi (perlekatan) antarkepala spermatozoa pada 10 lapang pandang di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

Karakterisasi Protein Plasma

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi jenis protein dari plasma kaput, korpus, kauda epididimis, dan seminalis dengan *marker* berat molekul rendah (LMW, Bio-Rad

Laboratories). Setiap sampel dilarutkan dalam larutan *double-strength sample buffer* (pH 6.8) yang berisi tris-HCl 125 mM, SDS 4%, 2-mercaptoethanol 10%, glycerol 20%, dan bromophenol biru 0.02 ml. Campuran tersebut dihangatkan dalam *waterbath* selama 3 menit. SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan 10-15% *acrylamide linear gradient gel* dan *Laemmli's buffer*. Gel direndam dalam ethanol 15%, methanol 25%, dan larutan fiksatif asam asetat 10% selama 1-2 jam, kemudian diwarnai dengan pewarna *commassie blue*.

Setelah *running* elektroforesis dan pewarnaan, dilakukan penghitungan jarak antarband pada gel akrilamid untuk ditransformasi ke bentuk logaritma, sehingga diperoleh berat molekul protein tersebut. Untuk mengetahui jenis dan nama protein, sampel dan marker dibandingkan.

Analisis Statistika

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap faktorial. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji Tuckey (Steel dan Torrie, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebaran Antiaglutinin dengan Kajian Aglutinasi Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat aglutinasi spermatozoa menurun dan berbeda nyata (P<0.01) seiring dengan pertambahan waktu inkubasi di setiap spermatozoa yang digunakan (Tabel 1 dan Gambar 1). Harayama dan Kato (2002), melaporkan bahwa tingkat aglutinasi spermatozoa meningkat dengan semakin lamanya spermatozoa diinkubasi pada suhu 38.5°C, dengan titik tertinggi ditemukan pada

waktu inkubasi 1 jam dan mengalami penurunan kembali dengan semakin lamanya waktu inkubasi.

Untuk waktu inkubasi 1 jam, tingkat aglutinasi tertinggi ditemukan pada spermatozoa asal korpus epididimis dengan frekuensi aglutinasi 36.77%, sedangkan terendah dan berbeda nyata (P<0.01) ditemukan pada spermatozoa asal kauda epididimis dengan frekuensi aglutinasi 25.77%. Hasil ini menunjukkan bahwa secara tidak langsung antiaglutinin tertinggi mungkin terikat di spermatozoa asal kauda epididimis, sedangkan antiaglutinin terendah terikat pada spermatozoa asal korpus epididimis. Hasil yang sama juga ditemukan pada waktu inkubasi 3, 5, dan 7 jam. Menurut Harayama *et al.*, (2000), pemisah aglutinasi (antiaglutinin) merupakan protein yang disekresikan dari sel-sel epitel lumen korpus dan dialirkan ke kauda epididimis sehingga protein tersebut terikat pada akrosom spermatozoa, dan sel-sel epitel epididimis aktif mensekresikan cairan yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama berada di dalam epididimis (Okamura *et al.*, 1995).

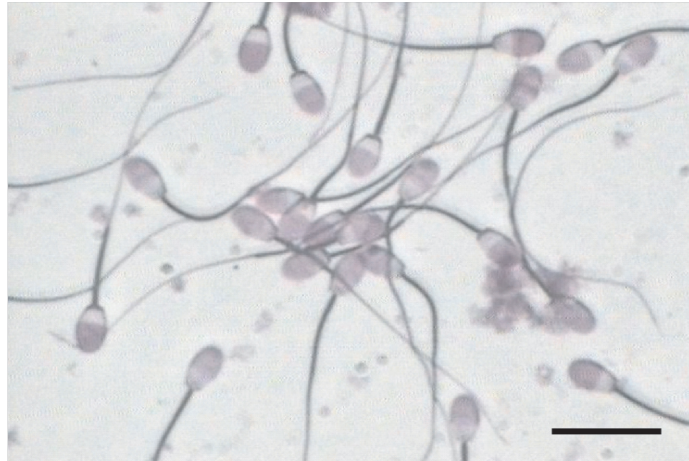
Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara tidak langsung keberadaan dan sebaran antiaglutinin tertinggi tetap ditemukan di kauda epididimis sedangkan keberadaan dan sebaran antiaglutinin terendah ditemukan di korpus epididimis. Hasil juga menunjukkan bahwa protein plasma yang diduga diikat oleh spermatozoa selama perjalanan di dalam epididimis diperlukan untuk perubahan struktur morfologi.

Preparasi spermatozoa diperlukan untuk proses fertilisasi *in vitro*. Preparasi bertujuan untuk menyeleksi dengan cara mencuci, sentrifugasi, dan inkubasi spermatozoa. Proses ini disebut dengan *swim up* (Yovich, 1995). Pada

Tabel 1 Tingkat aglutinasi spermatozoa asal kaput, korpus, kauda epididimis, dan ejakulat domba pada kultur *in vitro*

AsalSpermatozoa	Tingkat aglutinasi spermatozoa setelah inkubasi (%)			
	1 jam	3 jam	5 jam	7 jam
Caput Epididymis	32.80 ± 1.06 ^{aB}	20.93 ± 0.37 ^{bB}	9.80 ± 0.94 ^{cB}	5.10 ± 0.30 ^{dA}
Corpus Epididymis	36.77 ± 1.22 ^{aA}	22.67 ± 1.09 ^{bA}	12.10 ± 0.55 ^{cAB}	6.60 ± 0.73 ^{dA}
Cauda Epididymis	25.77 ± 1.21 ^{aC}	16.90 ± 1.23 ^{bC}	7.10 ± 0.91 ^{cC}	2.03 ± 0.52 ^{dB}
Ejakulat	33.20 ± 1.20 ^{aB}	23.00 ± 1.35 ^{bA}	11.40 ± 1.13 ^{cA}	3.23 ± 0.39 ^{dB}

Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a-d: P<0,01)
Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A-C: P<0,01)



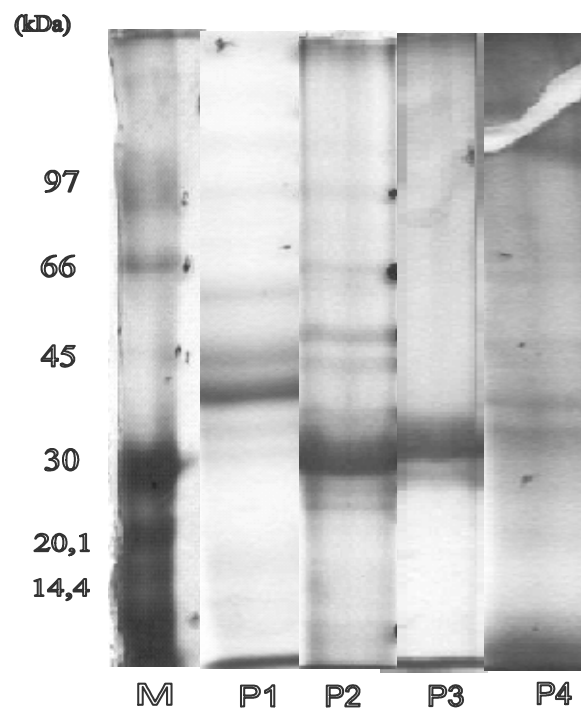
Gambar 1 Aglutinasi antarkepala spermatozoa domba dengan pewarnaan Giemsa 10%. Bar: 50 µm

fertilisasi *in vitro*, spermatozoa dicuci dalam medium kapasitasi kemudian diinkubasi dalam CO₂ 5 % dengan suhu 38.5 °C, karena hanya spermatozoa yang motil saja yang akan digunakan pada proses tersebut (Boediono *et al.*, 2000a; 2000b). Teknik preparasi spermatozoa (Inaudi *et al.*, 2002; Zavos *et al.*, 2000) yang digunakan dalam penelitian diduga menyebabkan penurunan tingkat aglutinasi spermatozoa. Proses pencucian dan inkubasi spermatozoa (Suzuki *et al.*, 1994) bahkan bisa menyebabkan penurunan persentase kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Rathi *et al.*, 2001; Yanagimachi, 1994). Meskipun dengan suhu yang sama, semakin lama inkubasi menyebabkan terlepasnya ikatan antarkepala spermatozoa yang secara tidak langsung juga menyebabkan penurunan tingkat aglutinasi karena suhu inkubasi akan berhubungan langsung dengan reaksi akrosom (Zou dan Yang, 2000), hipermotilitas (Mortimer *et al.*, 1998), dan kematian spermatozoa.

Karakterisasi Protein Plasma

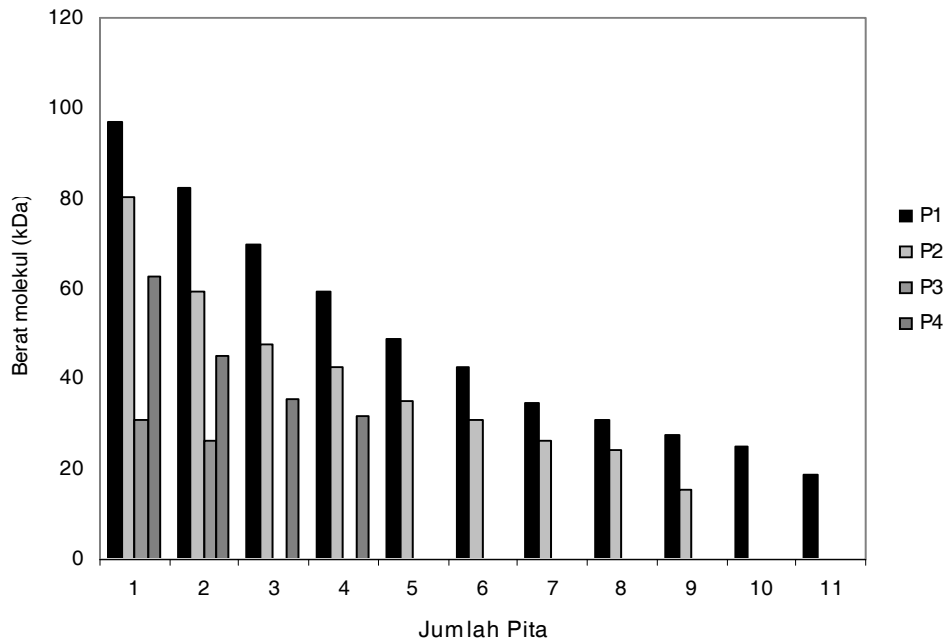
Analisis protein dengan metode SDS-PAGE menunjukkan hasil yang berbeda pada setiap sampel (Gambar 2). Sebaran protein dengan intensitas tertinggi ditemukan pada kisaran 25–40 kDa. Sebaran protein dengan intensitas sedang ditemukan pada kisaran 45–60 kDa dan sebaran protein dengan intensitas paling rendah ditemukan pada kisaran >60 kDa dan <20 kDa.

Perbandingan jumlah titik dan berat protein hasil SDS-PAGE menunjukkan hasil yang berbeda pada setiap sampel (Gambar 3). Pada plasma kaput epididimis ditemukan 11



Gambar 2 Interpretasi protein hasil SDS-PAGE. M. Marker, P1. plasma kaput epididimis (11 pita), P2. plasma korpus epididimis (9 pita), P3. plasma kauda epididimis (2 pita), dan P4. plasma seminalis (4 pita)

protein, plasma korpus epididimis ditemukan 9 protein, plasma kauda epididimis ditemukan 2 protein, dan plasma seminalis ditemukan 4 protein. Persamaan berat molekul protein ditemukan pada sampel plasma yang diambil



Gambar 3 Perbandingan jumlah pita dan berat protein hasil SDS-PAGE. P1. plasma kaput epididimis, P2. plasma korpus epididimis, P3. plasma kauda epididymis, P4. plasma seminalis

dari daerah epididimis (kaput, korpus, dan kauda) yaitu dengan berat molekul 30.974 kDa. Hasil sebaliknya ditemukan pada sampel plasma seminalis. Diduga kespesifikan pada epididimis domba yang mengandung protein dengan berat molekul 30.974 kDa (data tidak ditampilkan). Hasil ini juga menunjukkan adanya kesamaan dengan hasil penelitian sebelumnya. Pada penelitian tersebut, ditemukan sebaran antiaglutinin yang berbeda pada epididimis dan sebaran tertinggi pada kauda (Tabel 1). Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa protein antiaglutinin pada domba diduga ditemukan pada sampel dari epididimis (kaput, korpus, atau kauda). Ketika sampel dikarakterisasi dengan metode SDS-PAGE, juga ditemukan adanya kesamaan protein pada epididimis. Akan tetapi, kemungkinan jumlah dan keberadaan protein tersebut berbeda di setiap bagian epididimis. Konsentrasi tertinggi diduga terdapat pada bagian distal kaput dan proksimal kauda epididimis. Menurut Harayama *et al.*, (2000), protein antiaglutinin disekresikan dari sel-sel epitel lumen korpus dan dialirkan ke kauda epididimis, sehingga protein antiaglutinin tersebut diikat pada akrosom spermatozoa (Harayama *et al.*, 1994), dan sel-sel epitel epididimis aktif mensekresikan cairan yang

dibutuhkan untuk spermatozoa selama berada di epididimis (Okamura *et al.*, 1992).

SIMPULAN

Tingkat aglutinasi tertinggi ditemukan pada spermatozoa asal korpus epididimis dan terendah pada spermatozoa asal kauda epididimis domba. Sebaran protein dengan intensitas tertinggi ditemukan pada kisaran 25-40 kDa ditemukan pada epididimis. Hasil karakterisasi dengan metode SDS-PAGE, ditemukan 11 pita protein pada plasma kaput epididimis, 9 pita pada plasma korpus epididimis, 2 pita di plasma kauda epididimis, dan 4 pita pada plasma seminalis. Sehingga, pemanfaatan spermatozoa yang dikoleksi dari kauda dan ejakulat, dengan penambahan plasma asal kauda epididimis domba bisa dilakukan secara bersamaan dalam persiapan spermatozoa untuk keperluan fertilisasi *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dengan dana Proyek Penelitian Hibah Pascasarjana, Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Institut Pertanian Bogor (LPPM-IPB) tahun

anggaran 2005/2006 Tahap 1, dan merupakan bagian dari penelitian untuk penyusunan tesis dalam rangka menyelesaikan studi S2 (Magister) pada Jurusan Biologi Reproduksi Institut Pertanian Bogor. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada lembaga tersebut di atas, Lab Biokimia PAU IPB, Lab Embriologi FKH IPB beserta staf dan seluruh kolega yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Boediono A, Rusiyantono Y, Muhammad K, Djuwita I, Herliatien. 2000a. Produksi embrio kambing dengan teknologi maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Veteriner* 7: 11-17.
- Boediono A, Rusiyantono Y, Djuwita I, Muhammad K, Godke RA. 2000b. Kloning embrio dengan pembuatan kembar identik melalui rekayasa embrio. *Prosiding Bioteknologi Pertanian*: 28-35.
- Djuwita I, Rusiyantono Y, Kusdiantoro M, Purwantara B, Sukra Y. 1998. Pengaruh serum homolog dan heterolog terhadap proses pematangan dan pembuahan oosit domba di dalam medium biakan *in vitro*. *Media Veteriner* 5: 7-10.
- Haviz M, Agungpriyono S, Boediono A, Fakhrudin M, Setiadi MA. 2007. Sebaran anti aglutinin spermatozoa yang dikoleksi dari epididymis dan ejakulat domba. *Jurnal Veteriner* 8 (1): 24-31.
- Harayama H, Kato S. 2002. Relationship between bicarbonat and cyclic nucleotide in the promoting effects on head-to-head agglutination in boar spermatozoa. *Asian J Androl* 4: 83-86.
- Harayama H *et al*. 2000. Biochemical characterization of sialoprotein anti-agglutinin purified from boar epididymal and seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 55: 96-103.
- Harayama H, Miyano T, Miyake M, Kusunoki H, Kato S. 1994. Identification of anti-agglutinin in epididymal plasma of boar. *Mol Reprod Dev* 37: 436 (Abstract).
- Inaudi P, Petrilli S, Joghtapour A, Trusso P, Petraglia F. 2002. Reduction of steps in the preparation of motile sperm for intrauterine insemination does not reduce efficacy of procedure: simplified one-step swim-up method versus classic swim up. *Human Reprod* 17: 1288-1291.
- Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. 1998. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reprod* 13: 2139-2146.
- Okamura N *et al*. 1995. Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific a-mannosidase. *Mol Reprod Dev* 42: 141-148.
- Okamura N *et al*. 1992. Localization of a maturation-dependent epididymal sperm surface antigen recognized by a monoclonal antibody raised against a 135-kilodalton protein in porcine epididymal fluid. *Biol Reprod* 47: 1040-1052.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 65: 462-470.
- Rizal M, Herdis, Boediono A. 2004. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5°C). *J Anim Product* 6: 30-36.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Terjemahan edisi-2. Jakarta: PT Gramedia Utama.
- Suzuki K, Ebihara M, Nagai T, Clarke NGE, Harrison RAP. 1994. Importance of bicarbonate/CO₂ for fertilization of pig oocytes *in vitro*, and synergism with caffeine. *Reprod Fertil Dev* 6: 211-227.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editor. *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd. Pp 189-317.
- Yovich JL. 1995. Sperm preparation for assisted conception. In: Grudzinskas JG, Yovich JL. *Gametes The Spermatozoon*. New York: Cambridge University Press. Pp 268-281.
- Zavos PM, Abdallah A, Aslanis MJr, Correa. Zavos PN. 2000. Use of the multi-ZSC one-step standaridized swim-up method; recovery of high quality spermatozoa for intrauterine insemination or other forms of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 74: 834-835.
- Zou CX, Yang ZM. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. *Theriogenology* 53: 1477-1488.