

Gambaran Histopatologi Kauda Epididimis Domba yang Disimpan pada Suhu 4°C dalam Dulbecco's Modified Eagle Medium

(*THE HISTOPATHOLOGY OF RAM'S CAUDA EPIDIDYMIS STORED AT 4 °C WITH DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM*)

Faisal Amri Satrio, Sri Estuningsih, Ni Wayan Kurniani Karja*

Departmen Klinik, Reproduksi, dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agathis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680, Indonesia
*Email: karjanwk13@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this research was to analyze the cauda epididymis tissue damage after storage for four days at 4 °C with and without Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Fifteen pairs of cauda epididymis were collected from slaughterhouse. One of the cauda epididymis was stored in centrifuge tube with DMEM, while the other in centrifuge tube without DMEM. Histopathological preparations of cauda epididymis were made after stored for 0 day (H-0), 24 hours (H-1), 48 hours (H-2), 72 hours (H-3) and 96 hours (H-4) at 4 °C. The results showed that the capsule of cauda epididymis significantly thickened in H-2 for stored without DMEM and H-4 for stored with DMEM ($P<0.05$). Epithelial damage of cauda epididymis that were stored with and without DMEM significantly increased from H-1 ($P<0.05$). However, the level of epithelial damage in H-4 for stored with DMEM was less than stored without DMEM ($P<0.05$). In conclusion, the storage of cauda epididymis at 4 °C in DMEM can reduce the level of cauda epididymis epithelial damage until 96 hours and inhibit the level of capsule of cauda epididymis until 48 hours.

Keywords: cauda epididymis; DMEM; storage; tissue damage

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kerusakan jaringan kauda epididimis domba selama empat hari penyimpanan dengan atau tanpa DMEM pada suhu 4 °C. Sebanyak 15 pasang kauda epididimis dikoleksi dari tempat pemotongan hewan dan disimpan dengan cara salah satu dari setiap pasang kauda epididimis dimasukkan ke dalam DMEM dan bagian lainnya disimpan tanpa menggunakan DMEM. Preparat histopatologi jaringan kauda epididimis dilakukan setelah penyimpanan pada suhu 4 °C (H-0), lalu dilanjutkan setelah penyimpanan pada suhu 4 °C selama 24 jam (H-1), 48 jam (H-2), 72 jam (H-3), dan 96 jam (H-4). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kapsula kauda epididimis secara nyata mengalami penebalan pada H-2 untuk penyimpanan tanpa DMEM dan H-4 untuk penyimpanan menggunakan DMEM ($P<0,05$). Kerusakan epitel kauda epididimis mengalami peningkatan mulai H-1, namun jumlah kerusakan di H-4 pada penyimpanan menggunakan DMEM lebih sedikit dibandingkan tanpa menggunakan DMEM ($P<0,05$). Penelitian ini menyimpulkan bahwa penyimpanan kauda epididimis pada suhu 4 °C menggunakan DMEM dapat mengurangi tingkat kerusakan epitel kauda epididimis hingga jam ke-96 dan memperlambat kerusakan kapsula kauda epididimis hingga jam ke-48.

Kata-kata kunci: DMEM; kauda epididimis; kerusakan jaringan; penyimpanan

PENDAHULUAN

Epididimis secara anatomi terdiri dari tiga bagian yaitu kaput, korpus dan kauda epididimis (Elzoghby *et al.*, 2014; Akmal *et al.*, 2015).

Epididimis berperan penting menyediakan lingkungan mikro yang cocok untuk pematangan dan penyimpanan spermatozoa (Akmal *et al.*, 2015). Hal tersebut mengakibatkan spermatozoa dari kauda

epididimis memiliki kualitas yang sama dengan spermatozoa yang berasal dari ejakulat dan mempunyai kemampuan untuk memfertilisasi oosit (Pamungkas *et al.*, 2012; Safitri *et al.*, 2017). Namun, kerusakan jaringan pada kauda epididimis setelah kematian hewan sering terjadi akibat lingkungan mikro tidak dapat mendukung suatu jaringan untuk bertahan hidup maupun berkembang. Lingkungan tersebut berupa keadaan anoksia dan kekurangan nutrisi pada jaringan yang dapat menyebabkan stres metabolik hingga kematian sel (Fulda *et al.*, 2010; Mason dan Rathmell, 2011). Berbagai upaya telah dilakukan untuk mencegah kerusakan jaringan setelah kematian hewan, salah satunya penyimpanan kauda epididimis pada suhu 4 °C. Hal tersebut dilakukan untuk menekan metabolisme sel, konsumsi nutrien dan oksigen, sehingga mampu menurunkan akumulasi produk sampingan (asam laktat dan amonia) dan mencegah kematian sel (Kumar *et al.*, 2007; Freund dan Croughan, 2018). Lebih lanjut, Monteiro *et al.* (2013) menyatakan bahwa penyimpanan jaringan pada suhu 4 °C bertujuan untuk menghambat proses degenerasi jaringan.

Metode penyimpanan kauda epididimis pada suhu 4 °C telah digunakan sebagai sarana transportasi jarak jauh bagi kauda epididimis dari tempat kematian hewan menuju tempat pengolahan spermatozoa (Lone *et al.*, 2011). Selain itu, metode tersebut digunakan sebagai metode alternatif dalam upaya penyelamatan plasma nutfah dari suatu spesies yang terancam punah (Lima *et al.*, 2013). Hingga saat ini, penggunaan metode ini lebih banyak dikaitkan dengan kualitas spermatozoa pada berbagai spesies, di antaranya kucing (Angrimani *et al.*, 2017), domba (Masir *et al.*, 2017; Safitri *et al.*, 2017), anjing (Hori *et al.*, 2015), kuda (Monteiro *et al.*, 2013), dan sapi (Bhakat *et al.*, 2011). Kualitas spermatozoa berupa motilitas mampu bertahan sekitar 45% pada kauda epididimis yang disimpan selama empat hari pada suhu 4 °C (Hori *et al.*, 2009; Abella *et al.*, 2014). Namun, gambaran histologis mengenai kerusakan jaringan yang terjadi pada kauda epididimis selama penyimpanan pada suhu rendah belum pernah dilaporkan.

Selain metode, media penyimpanan juga menjadi hal penting dalam penyimpanan kauda epididimis suhu 4 °C. Penelitian Toyonaga *et al.* (2010) menunjukkan bahwa kauda epididimis kucing yang disimpan dalam larutan salin fisiologis steril selama 24 jam pada suhu 4 °C

memiliki kualitas spermatozoa terbaik untuk dibekukan. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa kualitas spermatozoa dari kauda epididimis anjing dan kucing terlihat lebih baik ketika disimpan menggunakan pengencer tris kuning telur dibandingkan dengan larutan salin isotonis steril pada suhu 4 °C selama 24 jam (Tittarelli *et al.*, 2006). Hal tersebut mengindikasikan bahwa penyimpanan kauda epididimis pada suhu 4 °C memerlukan nutrisi yang lengkap. Salah satu media yang memiliki kandungan nutrisi lengkap adalah *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Media tersebut telah banyak digunakan sebagai medium untuk kultur sel (Xiu-Wen *et al.*, 2013; Andiana *et al.*, 2017). Media DMEM mengandung vitamin dan asam amino empat kali lebih besar dan mengandung glukosa sebanyak dua hingga empat kali lebih banyak dibandingkan medium kultur lainnya (Andiana *et al.*, 2017). Media tersebut juga mengandung *buffer* berupa natrium bikarbonat (NaHCO₃) sebagai sumber karbonat. *Buffer* tersebut dapat berfungsi untuk mempertahankan pH (Pellegrin *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2011). Penggunaan DMEM dalam penyimpanan kauda epididimis diharapkan dapat mengurangi atau menghambat tingkat kerusakan jaringan kauda epididimis selama penyimpanan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kerusakan jaringan kauda epididimis setelah penyimpanan pada suhu 4 °C selama empat hari dengan dan tanpa DMEM. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi dasar terkait perubahan histologis jaringan kauda epididimis setelah penyimpanan pada suhu 4 °C selama empat hari dengan dan tanpa DMEM. Lebih lanjut, penelitian ini dapat diaplikasikan untuk tata cara penyimpanan sampel kauda epididimis suatu hewan sebelum dilakukan koleksi spermatozoa.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Penelitian menggunakan 15 pasang kauda epididimis domba yang telah mengalami dewasa kelamin (ditandai dengan motilitas spermatozoa dari kauda epididimis $\geq 70\%$). Medium penyimpanan yang digunakan adalah *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (GibcoBRL[®], cat no: 12100-038, Lot No: 1101712, Paisley, Scotland, UK).

Koleksi dan Penyimpanan Kauda Epididimis

Testis beserta dengan epididimis dikoleksi dari tempat pemotongan domba di sekitar kampus IPB Dramaga, Bogor kemudian ditransportasikan ke laboratorium dalam plastik bersih dan *sterofoam* box. Setelah sampai di laboratorium, epididimis dipisahkan dari testis kemudian bagian atas kauda epididimis diikat menggunakan benang steril dan dilakukan pemisahan dengan bagian korpus epididimis. Kauda epididimis kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl fisiologis dan sesegera mungkin dilakukan sedikit sayatan agar spermatozoa keluar dari lumen untuk pemeriksaan motilitas spermatozoa. Hanya kauda epididimis dengan motilitas spermatozoa $\geq 70\%$ yang digunakan dalam penelitian ini.

Penyimpanan kauda epididimis dilakukan dengan cara salah satu dari setiap pasang kauda epididimis dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* yang berisi 20 mL DMEM (seluruh permukaan kauda epididimis terendam DMEM). Pasangan yang lain kemudian dimasukkan ke dalam plastik bersih tanpa DMEM dan dimasukkan ke dalam *centrifuge tube*. Selanjutnya, pembuatan preparat histopatologi jaringan kauda epididimis dilakukan sebelum penyimpanan pada suhu 4 °C (H-0), lalu dilanjutkan setelah penyimpanan pada suhu 4 °C selama 24 jam (H-1), 48 jam (H-2), 72 jam (H-3), dan 96 jam (H-4).

Pembuatan dan Pewarnaan Sediaan Histopatologi

Setiap sampel pengamatan dimasukkan ke dalam larutan BNF 10% untuk dibuat sediaan histopatologi. Sampel kauda epididimis dipotong dengan ketebalan kurang lebih 0,5 cm dan didehidrasi menggunakan alkohol konsentrasi bertingkat (mulai alkohol 70% hingga alkohol absolut). Preparat kemudian dijernihkan dengan xylol, lalu diinfiltrasi menggunakan parafin cair dan dilakukan *embedding* dalam blok parafin, untuk selanjutnya dipotong dengan ketebalan lima mikron dan diwarnai menggunakan hematoxilin dan eosin (HE) sesuai prosedur yang dilakukan oleh Feldman dan Wolfe (2014).

Pengamatan Penelitian dan Analisis Data

Preparat histopatologi kauda epididimis kemudian dilakukan pengamatan berupa perubahan ketebalan kapsula dan persentase

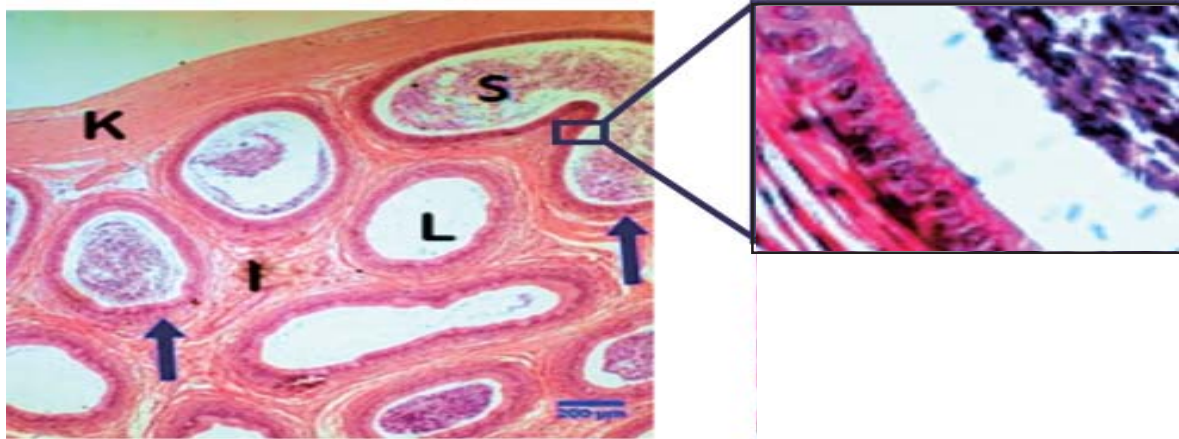
kerusakan epitel kauda epididimis. Pengamatan tersebut diulang sebanyak tiga kali ulangan (menggunakan preparat histopatologi yang berbeda dengan perlakuan sama). Ketebalan kapsula kauda epididimis diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran empat kali pada 15 lapang pandang. Kerusakan epitel kauda epididimis (berupa deskuamasi sel epitel) diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40 kali pada sepuluh lapang pandang. Pengukuran ketebalan kapsula dan jumlah kerusakan epitel kauda epididimis menggunakan *software ImageJ*[®] 1.46.

Data rata-rata ketebalan kapsula dan persentase kerusakan epitel kauda epididimis dianalisis statistika menggunakan uji sidik ragam satu arah pada taraf nyata 95%, apabila terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Data diolah menggunakan program IBM SPSS *statistic* versi 22.0.

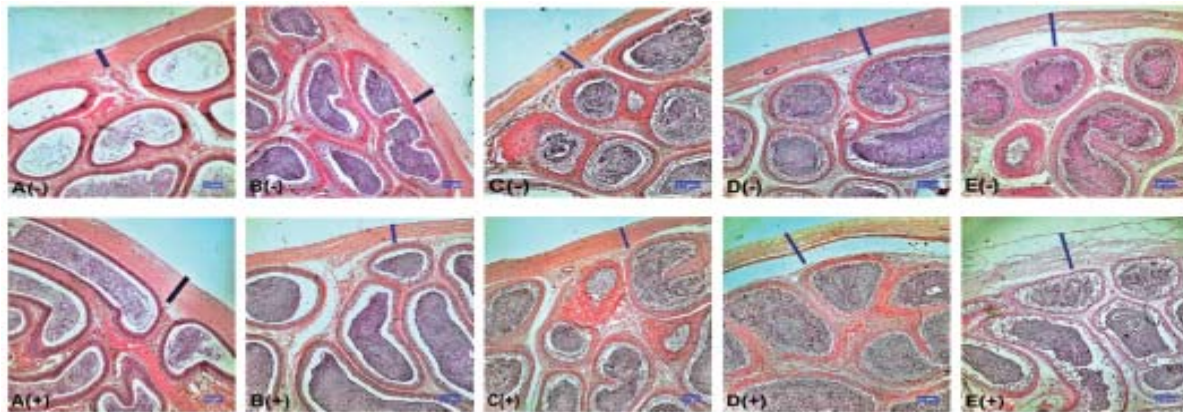
HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran Umum Kauda Epididimis

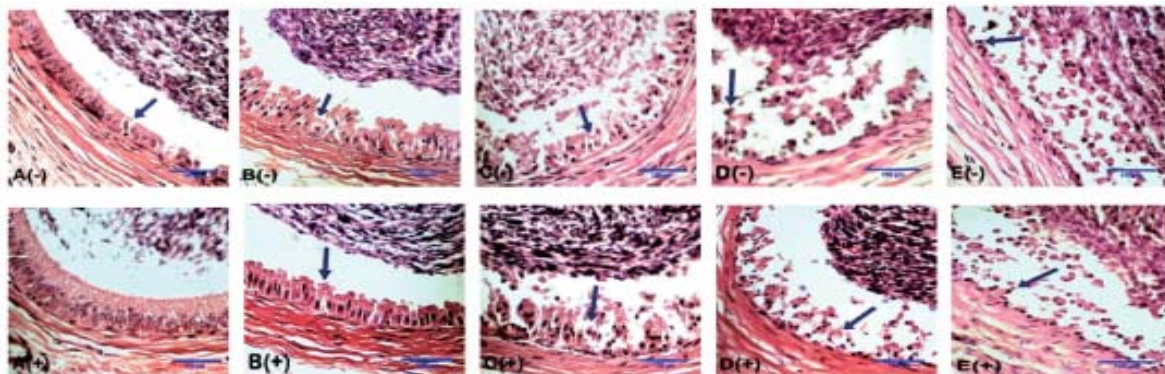
Hasil pengamatan histopatologi menunjukkan bahwa bagian kauda epididimis terdiri atas kapsula, duktus, lumen, dan jaringan interstisial (Gambar 1). Kapsula kauda epididimis merupakan bagian terluar dari kauda epididimis dan memiliki komponen berupa jaringan ikat. Jaringan ikat pada kapsula kauda epididimis termasuk kedalam jaringan ikat padat tidak beraturan/*irregular* dan memiliki serabut kolagen tipe I yang dibentuk oleh banyak fibroblast (Wrobel dan Bregmann, 2006; Samuelson, 2007). Duktus epididimis terdiri dari epitel silindris banyak baris dengan sterosilia (Wahyuni *et al.*, 2012; Elzoghby *et al.*, 2014; Kempinas dan Klinefelter, 2014) dan memiliki lumen yang di tengahnya terdapat spermatozoa (Elzoghby *et al.*, 2014). Selain itu, kauda epididimis memiliki ciri khas lain berupa epitel kauda epididimis terlihat lebih tipis dibandingkan dengan bagian epididimis lainnya (Wahyuni *et al.*, 2012; Kempinas dan Klinefelter, 2014). Duktus kauda epididimis dikelilingi oleh lapisan otot polos, dan di antara duktus epididimis terdapat jaringan interstisial yang memiliki komponen berupa jaringan ikat longgar (Wrobel dan Bregmann, 2006; Samuelson, 2007; Elzoghby *et al.*, 2014).



Gambar 1. Fotografi mikro keadaan umum kauda epididimis (gambar kontrol) menggunakan pewarnaan HE perbesaran 4x; kapsula (K), epitel kauda epididimis (panah biru), epitel kauda epididimis setelah diperbesar 40x (dalam kotak) lumen duktus (L), jaringan interstisial (I), dan spermatozoa (S). Skala garis: 200 μ m.



Gambar 2. Fotografi mikro ketebalan kapsula kauda epididimis (gambar biru) dengan pewarnaan HE dan perbesaran 4x. Tanpa penyimpanan kauda epididimis (A), penyimpanan 24 jam (B), penyimpanan 48 jam (C), penyimpanan 72 jam (D), penyimpanan 96 jam (E), penyimpanan kauda epididimis menggunakan DMEM (+) dan tanpa menggunakan DMEM (-).Skala garis: 200 μ m.



Gambar 3. Fotografi mikro kerusakan epitel kauda epididimis yang ditandai dengan deskuamasi sel epitel (panah biru) menggunakan pewarnaan HE dan perbesaran 40x. Tanpa penyimpanan kauda epididimis (A), penyimpanan 24 jam (B), penyimpanan 48 jam (C), penyimpanan 72 jam (D), penyimpanan 96 jam (E), penyimpanan kauda epididimis menggunakan DMEM (+) dan tanpa menggunakan DMEM (-).Skala garis: 100 μ m.

Perubahan Histopatologi Kapsula Kauda Epididimis

Kapsula kauda epididimis merupakan bagian terluar yang berfungsi untuk melindungi kauda epididimis dari tekanan dan regangan (Samuelson, 2007). Perubahan ketebalan dan mikrofotografi dari kapsula kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4 °C dengan dan tanpa DMEM seperti disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketebalan kapsula kauda epididimis yang disimpan tanpa menggunakan DMEM mengalami kenaikan secara signifikan (P<0.05) mulai dari H-1 hingga H-2, kemudian mengalami penurunan kembali pada H-4 (P<0.05). Sementara itu, ketebalan kapsula kauda epididimis yang disimpan menggunakan DMEM baru terlihat mengalami kenaikan secara signifikan pada H-4 (P<0.05).

Proses peningkatan ketebalan kapsula terjadi karena jaringan kauda epididimis mengalami kekurangan asupan oksigen dan nutrisi akibat tidak adanya aliran darah setelah kematian hewan. Hal tersebut menyebabkan stres pada tingkat seluler, nekrosis, dan berakhir pada kematian sel (Escobar *et al.*, 2015; Kalogeris *et al.*, 2012). Sel kauda epididimis dalam keadaan kekurangan oksigen akan menurunkan produksi *adenosine triphosphate*/ATP (Lemasters, 2018), sehingga mengakibatkan adanya gangguan pada pompa ion sodium-potasium (Na⁺-K⁺). Dalam kondisi normal, energi yang dihasilkan ATP digunakan oleh pompa ion sodium-potasium untuk menjaga keseimbangan ion baik sodium, potasium, dan kalsium yang terdapat di bagian dalam sel (Escobar *et al.*, 2015). Ketidakseimbangan ion pada sel menyebabkan peningkatan tekanan osmotik (Lemasters, 2018). Keadaan tersebut

menyebabkan air yang berada di luar sel berpindah secara pasif melewati membran dalam sel sehingga sel mengalami pembengkakan. Pembengkakan sel mengaktifasi dan mengeluarkan enzim lisosom yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel (Kalogeris *et al.*, 2012). Kerusakan membran sel tersebut menyebabkan isi sel keluar menuju bagian ekstraseluler (Kalogeris *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2015; Lemasters, 2018).

Penggunaan DMEM diduga dapat menghambat aktivasi enzim lisosom dan kerusakan membran sel. Menurut Lemasters (2018) dan Myers *et al.* (2012), aktivasi enzim lisosom dapat disebabkan oleh penurunan pH sel yang semakin asam akibat glikolisis anaerob. Media DMEM mengandung nutrisi yang lengkap dan *buffer* sehingga mampu menetralkan pH dalam sel (Pellegrin *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2011). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa penebalan kapsula kauda epididimis baru terjadi pada hari keempat penyimpanan pada suhu 4 °C menggunakan DMEM. Di sisi lain, penurunan ketebalan kapsula kauda epididimis yang disimpan tanpa menggunakan DMEM pada hari keempat diduga akibat serabut jaringan ikat penyusunnya telah mengalami kerusakan.

Perubahan Histopatologi Epitel Kauda Epididimis

Kerusakan epitel ditandai dengan lepasnya sel epitel dari membran basal atau deskuamasi sel (Gambar 3). Persentase kerusakan epitel kauda epididimis yang disimpan selama empat hari pada suhu 4 °C dengan dan tanpa DMEM seperti disajikan pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase kerusakan

Table 1. Ketebalan (µm) kapsula kauda epididimis yang disimpan selama empat hari pada suhu 4 °C dengan dan tanpa DMEM

Kelompok perlakuan	DMEM (-)	DMEM (+)
H-0	227,3 ± 64,6 ^a	242,4 ± 66,8 ^a
H-1	254,0 ± 45,0 ^b	247,0 ± 52,8 ^a
H-2	301,9 ± 77,2 ^{c*}	244,5 ± 50,2 ^{a**}
H-3	282,1 ± 55,7 ^{c,d}	266,9 ± 64,0 ^a
H-4	256,0 ± 61,1 ^{b,e*}	295,0 ± 76,4 ^{b**}

Ket: data disajikan dalam bentuk rata-rata persentase dengan standar deviasi. Huruf superskrip yang berbeda pada kolom (a,b,c,d) dan baris (*,**) yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05). H-0: tidak dilakukan penyimpanan, H-1: penyimpanan 24 jam, H-2: penyimpanan 48 jam, H-3: penyimpanan 72 jam, H-4: penyimpanan 96 jam.

Table 2. Persentase kerusakan epitel kauda epididimis yang disimpan selama empat hari pada suhu 4 °C dengan dan tanpa DMEM

Kelompok Perlakuan	DMEM (-)	DMEM (+)
H-0	8,9 ± 13,9 ^a	8,0 ± 7,7 ^a
H-1	54,4 ± 14,8 ^b	51,1 ± 13,5 ^b
H-2	59,1 ± 11,4 ^{b,c}	55,2 ± 8,8 ^{b,c}
H-3	64,3 ± 8,8 ^c	59,1 ± 7,9 ^{c,d}
H-4	70,6 ± 7,4 ^{d*}	62,9 ± 8,4 ^{d**}

Ket: data disajikan dalam bentuk rata-rata dengan standar deviasi. Huruf superskrip yang berbeda pada kolom (a,b,c,d) dan baris (*,**) yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). H-0: tidak dilakukan penyimpanan, H-1: penyimpanan 24 jam, H-2: penyimpanan 48 jam, H-3: penyimpanan 72 jam, H-4: penyimpanan 96 jam.

epitel kauda epididimis mengalami peningkatan seiring dengan penambahan hari penyimpanan. Peningkatan kerusakan epitel kauda epididimis secara signifikan terlihat pada H-1 penyimpanan dengan dan tanpa DMEM ($P < 0,05$). Penyimpanan kauda epididimis dengan DMEM memiliki persentase kerusakan epitel yang lebih rendah dari pada penyimpanan tanpa DMEM, dan hal tersebut terlihat signifikan pada H-4 penyimpanan ($P < 0,05$).

Hal ini terjadi karena kauda epididimis yang disimpan sudah tidak mendapatkan pasokan oksigen dan nutrisi akibat kematian hewan. Selama kekurangan oksigen sel epitel kauda epididimis melakukan glikolisis anaerob untuk mendapatkan pasokan ATP (Pellegrin *et al.*, 2008; Kalogeris *et al.*, 2012). Keadaan tersebut menyebabkan terjadi akumulasi asam laktat, proton dan NAD^+ sehingga berdampak pada penurunan pH sel. Sel berusaha menormalkan pH dengan cara mengeluarkan H^+ dari dalam sel dan sebagai penggantinya memasukkan Na^+ ke dalam sel melalui *plasmalemmal Na^+/H^+ exchanger*. Hal tersebut berdampak pada peningkatan Ca^{2+} di dalam sel akibat bertukar dengan Na^+ melalui *plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger* (Kalogeris *et al.*, 2012). Peningkatan Ca^{2+} akan mengaktifkan fosfolipase kemudian berdampak pada pelepasan dan aktivasi enzim lisosom (Kalogeris *et al.*, 2012; Myers *et al.*, 2012). Keadaan tersebut dapat menyebabkan kerusakan membran plasma. Mekanisme lain yang memungkinkan adalah kekurangan ATP pada level seluler mengakibatkan metabolisme menjadi anaerob. Hal tersebut menurunkan glikogen dan meningkatkan asam laktat, sehingga pH di dalam sel menjadi asam. Perubahan pH tersebut menyebabkan pelepasan dan aktivasi

enzim lisosom dan berakhir pada kerusakan membran sel (Kalogeris *et al.*, 2012; Myers *et al.*, 2012; Lemasters, 2018). Kerusakan membran sel tersebut menyebabkan isi sel keluar ke bagian ekstraseluler dan berakhir pada kematian sel (Kalogeris *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2015; Lemasters, 2018).

Kerusakan epitel kauda epididimis sudah terlihat meningkat sejak H-1 penyimpanan dengan dan tanpa DMEM. Namun, penggunaan DMEM mampu menekan kerusakan epitel pada H-4 penyimpanan. Media DMEM mengandung nutrisi yang lengkap untuk metabolisme sel, ion yang lengkap untuk mempertahankan tekanan osmotik dan *buffer* untuk menetralkan pH sel (Pellegrin *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2011). *Buffer* di dalam DMEM berupa natrium bikarbonat (NaHCO_3), zat tersebut mampu menyeimbangkan CO_2 dan asam laktat hasil metabolisme sel (Pellegrin *et al.*, 2008). Kerusakan jaringan epitel kauda epididimis mengakibatkan gangguan reabsorpsi dan sekresi dari epitel. Epitel epididimis mensekresikan protein yang berfungsi sebagai media transportasi spermatozoa, aktivasi enzim, dan kapasitas spermatozoa (Akmal *et al.*, 2015).

SIMPULAN

Kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4 °C mengakibatkan penambahan ketebalan kapsula dan peningkatan kerusakan epitel seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan. Penggunaan DMEM ketika penyimpanan dapat mengurangi tingkat kerusakan epitel kauda epididimis hingga jam ke-96 dan memperlambat kerusakan kapsula kauda epididimis hingga jam ke-48.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian secara *in vitro* untuk melihat kualitas dan tingkat fertilitas spermatozoa dari kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4 °C dengan dan tanpa DMEM.

DAFTAR PUSTAKA

- Abella DF, Costa MD, Guerin Y, Dacheux JL. 2015. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4 °C. *Animal* 9(2): 313-319.
- Akmal M, Masyitah D, Hafizzuddin, Fitriani. 2015. Epididimis dan perannya dalam pematangan spermatozoa. *Jurnal Edukasi dan Sains Biologi* 4(2): 1-9.
- Andiana M, Rachmawati Y, Andayani SS. 2017. Kultur sel *baby hamster kidney* (BHK) menggunakan media *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM). *Biotropic* 1(1): 1-8.
- Angrimani DSR, Nagai KK, Bicudo LC, Losano JDA, Brito MM, Francischini MCP, Nichi M. 2017. Spermatic and oxidative profile of domestic cat (*Felis catus*) epididymal sperm subjected to different cooling times (24, 48, and 72 hours). *Reprod Dom Anim* 53(1): 163-170
- Bhakat M, Mohanty TK, Raina VS, Gupta AK, Pankaj PK, Mahapatra RK, Sarkar M. 2011. Study on suitable additives incorporation into the extender stored at refrigerated temperature. *Asian-Aust J Anim Sci* 24(10): 1384-1357.
- Carr AJ, Slater GJ, Gore CJ, Dawson B, Burke LM. 2011. Effect of sodium bicarbonate on [HCO₃⁻], pH, and gastrointestinal symptoms. *Int J Sport Nutr Exe* 21(3): 189-194.
- Elzoghby IMA, Sosa GA, Mona NAH, Manshway AA. 2014. Postnatal development of the epididymis in the sheep. *British Veterinary Medical Journal* 26(1): 67-74.
- Escobar ML, Echeverria OM, Vazques-Nin GH. 2015. Necrosis as programmed cell death. In *Cell Death-Autophagy, Apoptosis, and Necrosis*. Hlm. 419-434. Doi: dx.doi.org/10.5772/61483
- Feldman AT, Wolfe D. 2014. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In *Histopathology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Day CE (Ed). New York. Springer Science+Business Media. Pp. 31-43. Doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3.
- Freund NW, Croughan MS. 2018. A simple method to reduce both lactic acid and ammonium production in industrial animal cell culture. *Int J Mol Sci* 19(385): 1-22.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010(1687-8876): 214076. Doi: 10.1155/2010/214074
- Hori T, Atago T, Kobayashi M, Kawakami E. 2015. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post thaw caudal epididymal sperm quality. *J Vet Med Sci* 77 (5): 625-630.
- Hori T, Uehara Y, Kawakami E, Tsutsui T. 2009. Influence of the time between removal and cooling of the epididymis on post thaw caudal epididymal sperm quality. *J Vet Med Sci* 71(6): 811-815.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Bio* 298: 229-317. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7
- Kempinas WDG, Klinefelter GR. 2014. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 4(2): 1-12.
- Kumar N, Gammel P, Clynes M. 2007. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cryotechnolgy* 53: 33-46.
- Lemasters JJ. 2018. Molecular Mechanism of Cell Death. In *Molecular Pathology*, Second ed. Elsevier Inc. Hlm. 1-24. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802761-5.00001-8
- Lima ICS, Andrade IRA, Aguiar GV, Silva MM, Catunda AGV, Martins GA, Gadelha CRF, Campos ACN. 2013. In vitro evaluation of goat cauda epididymal sperm cooled in different extenders at 4°C. *Arch Zootec* 62(239): 429-437

- Lone FA, Islam R, Khan MZ, Sofi KA. 2011. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Anim Reprod Sci* 123(1-2): 54-59
- Masir U, Setiadi MA, Karja NWK. 2017. Status DNA dan karakteristik spermatozoa kauda epididimis domba pascapenyimpanan pada suhu 4 °C. *J Veteriner*. 18(2): 167-174
- Mason EF, Rathmell JC. 2011. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. *BBA-Biomembranes* 1813: 645-654.
- Monteiro GA, Guasti PN, Rocha AS, Martin I, Sancler-Silva YFR, Dell'Aqua CPF, Dell'Aqua JA, Papa FO. 2013. Effect of storage time and temperature od equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *J Equine Vet Sci* 33: 169-173.
- Myers RK, Gavin MDM, Zachary JF. 2012. Cellular Adaptation, Injury, and Death: Morphologic, Biochemist, and Genetic Disease. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease Fifth Edition*. Zachary JF, Gavin MDM (ed). Missouri. Elsevier Inc. Hlm. 2-59.
- Pamungkas FA, Setiadi MA, Karja NWK. 2012. Charasteristics and *in vitro* fertilization ability of ram spermatozoa: comparison of epididymal and ejaculated spermatozoa. *Media Peternakan* 35(1): 38-44. Doi: 10.5398/medpet.2012.35.1.38
- Pellegrin MP, Pinto RCV, Castilho LDR. 2008. Mechanism of Cells Proliferation and Cell Death In Animal Cell Culture *In Vitro*. In *Animal Cells Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Castilho LR, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (ed). Amilton Park Abingdon. Taylor and Francis Group. Hlm. 147-173.
- Safitri NA, Karja NWK, Setiadi MA, Fahrudin M. 2017. Daya fertilisasi spermatozoa kauda epididimis domba denan atau tanpa swimp up sebelum fertilisasi. *Acta Veteriner Indonesia* 5(1): 1-7.
- Samuelson DA. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Philadelphia. Saunders Elseveir. Hlm. 72-99.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudin E, Stronelli MC, Stronelli 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: 1637-1640.
- Toyonaga M, Sato Y, Morita M, Watanabe M, Oba H, Mizutani T, Hori T, Tsutsui T. 2010. The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymides stored at low temperature. *J Vet Med Sci* 72(6): 777-780
- Wahyuni S, Agungpriyono S, Agil M, Yusuf TL. 2012. Histologi dan histomorfometri testis dan epididimis muncak (*Muntiacus muntjak*) pada periode ranggah keras. *J Veteriner* 13(3): 211-219.
- Wrobel K-H, Bergmann M. 2006. Male Reproductive System. In *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. Sixth ed. Eurell JA, Frappier BL (ed). Oxford, UK. Blackwell Publishing Ltd. Hlm. 233-255.
- Xiu-Wen W, Ru-Feng W, Ming Y, Wei X, Xiu-Wei Y. 2013. Dulbecco's modified eagle medium and minimum essential medium which one is more preffered for establishment of Coco-2 cell monolayer model used in evaluation of drug absorbtion?. *Pharmazie* 68: 805-810.