

Optimalisasi Pembekuan Sperma Limbah Kauda Epididimis Kambing Lokal dengan Metode Bertahap dan Stabilisasi

Improving Cryopreservation of Waste Cauda Epididymis Spermatozoa from Local Buck using Stabilization and Multistep Methods

Naela Wanda Yusria Dalimunthe¹, M. Rosyid Ridlo¹, Agung Budiyanto²

¹Program Studi Kesehatan Hewan, Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Departemen Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
 Jl. Fauna No. 2 Karangmalang, Yogyakarta, 55281,
 Email: naela.wanda@ugm.ac.id ; agung_2004@ugm.ac.id

Abstract

Buck slaughtering produce waste such as testicles including epididymis which contain fertile sperm. Utilization of cauda epididymis as the sources of sperm for producing goat frozen sperm was not reported yet. The aims of this study were improving the frozen-thawed sperm using stabilization and multistep methods which recovered from the waste of buck slaughtering as the source of sperma. Cauda epididymis spermatozoa which was washed then diluted using extender 1 (Tris-citrate-antibiotics) and extender 2 (extender 1- glycerol-egg yolk). The extender 2 addition was performed by single or multistep methods then freezed. Modification in the pre freezing proces were performed by comparing the conventional equilibration and stabilization methods. The sperm suspension was incubated in 4°C for 2 hours after filling-sealing into straws on the equilibration group whether the stabilization group was cooled in tube 15 mL. All cooled straws from both groups were placed 4 cm horizontally on liquid nitrogen surface for 10 minutes and then plunged into liquid nitrogen for storage. The evaluation of motility parameters such as pattern of the movement and motility percentation were done followed the standard methodology. The student t-test, correlation and one-way ANOVA were used for data analysis with $P < 0.05$. The results showed that multistep dilution method could increase the motility ($25.0 \pm 1.8 \%$) compared with single step ($18.3 \pm 1.7 \%$). Pre freezing method with stabilization also resulted higher motility ($24.2 \pm 2.0 \%$) than equilibration method ($17.5 \pm 2.8 \%$). The pattern of the movement were not different between all methods and its combination. The multistep dilution method and stabilization cooling method as well as its combination seems could increase the quality of frozen-thawed cauda epididymis spermatpzoa of local buck.

Key words : sperm, cauda epididymis, cryopreservation, stabilization, multistep

Abstrak

Pemotongan kambing jantan menghasilkan limbah berupa testis termasuk di dalamnya epididimis yang mengandung sperma fertil. Pemanfaatan limbah epididimis dari pemotongan kambing sebagai bahan baku sperma beku belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kualitas sperma beku dengan menggunakan metode stabilisasi dan bertahap yang diperoleh dari limbah pemotongan kambing berupa kauda epididimis sebagai sumber sperma. Sperma kauda epididimis yang telah dicuci kemudian diencerkan dengan pengencer 1 (Tris-sitrat-antibiotik) dan pengencer 2 (pengencer 1-gliserol-kuning telur). Penambahan pengencer 2 dilakukan secara tunggal atau bertahap dan dilanjutkan pembekuan. Modifikasi proses pendinginan dilakukan dengan membandingkan metode equilibrasi konvensional dan metode stabilisasi. Suspensi sperma diinkubasi selama 2 jam dengan suhu 4°C di dalam *straw* mini pada kelompok equilibrasi, sedangkan kelompok stabilisasi inkubasi dilakukan di dalam tabung 15 mL. Setelah proses pendinginan, seluruh *straw* diletakkan 4 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 10 menit dan selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair untuk penyimpanan. Pemeriksaan parameter motilitas berupa pola gerakan individu dan persentase motilitas dilakukan berdasarkan metode standar pemeriksaan semen beku. Data dianalisa menggunakan metode *student t-test*, korelasi dan *one-way ANOVA* dengan angka

kepercayaan $P < 0.05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode penambahan pengencer 2 secara bertahap mampu memberikan persentase motilitas yang lebih tinggi secara signifikan ($25.0 \pm 1.8 \%$) dibanding secara tunggal ($18.3 \pm 1.7 \%$). Demikian juga dengan metode stabilisasi yang menunjukkan persentase motilitas yang lebih baik secara nyata ($24.2 \pm 2.0 \%$) dibandingkan dengan proses ekuilibrasi ($17.5 \pm 2.8 \%$). Pola gerakan sperma setelah pembekuan tidak menunjukkan adanya perbedaan meskipun dengan kombinasi kedua metode. Metode penambahan bertahap dan metode stabilisasi maupun kombinasi keduanya dapat meningkatkan kualitas sperma kauda epididimis kambing lokal setelah pembekuan.

Kata kunci : sperma, kauda epididimis, pembekuan, stabilisasi, bertahap

Pendahuluan

Pemotongan kambing khususnya kambing jantan menghasilkan produk pokok berupa daging dan menghasilkan limbah berupa testis (termasuk di dalamnya epididimis). Pemanfaatan limbah epididimis dari pemotongan kambing sebagai bahan baku sperma beku belum pernah dilakukan. Dalam penelitian ini, semen beku yang akan dihasilkan dengan pemanfaatan limbah epididimis dapat dipergunakan sebagai usaha penyelamatan genetik kambing lokal Jawa. Penelitian ini juga dapat memberikan manfaat sebagai pilihan terakhir untuk penyelamatan genetik dari hewan varietas unggul atau hewan langka/hewan dilindungi yang telah mati.

Saluran epididimis terdiri tubulus konvolutus yang panjang melingkar pada testis di mana bagian permukaan terhubung dengan duktus eferens dan duktus deferens dan secara anatomi epididimis dibedakan menjadi 3, yaitu *caput* (kepala), *corpus*, dan *cauda* (ekor) (Joseph and Hinton, 2009). Epididimis merupakan organ yang berperan dalam transpor sperma, konsentrasi dan maturasi. Fungsi maturasi melibatkan akuisisi dari pergerakan ke depan dari sperma dan kemampuan dalam fertilisasi (Cooper dan Yeung, 2006). Spermatozoa yang berada di proksimal epididimis memiliki motilitas dan viabilitas yang rendah sehingga tidak dapat membuahi baik dengan cara inseminasi buatan atau *in vitro*. Kemampuan sperma dalam memfertilisasi diperoleh saat spermatozoa transit di kauda epididimis (Perera and Ariyaratne, 2013).

Terbatasnya informasi mengenai standar data fisik berupa ukuran dan berat testis maupun epididimis serta data mengenai kualitas sperma epididimis kambing lokal yang diperoleh secara segar maupun setelah pembekuan menjadi perhatian peneliti. Selain itu, jika kesempatan untuk pembekuan sperma kambing unggul hanya diperoleh dari koleksi sperma epididimis maka diperlukan protokol yang tepat guna sehingga pengujian protokol pembekuan tersebut menjadi poin penting dari penelitian ini. Hipotesis pada penelitian ini adalah aplikasi metode bertahap dan stabilisasi dapat mempertahankan kualitas sperma kauda epididimis kambing secara *in vitro* setelah pembekuan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui data fisik organ testis dan epididimis kambing lokal dan kualitas sperma epididimis yang diperoleh dari tempat penyembelihan kambing, serta pengaruh penambahan pengencer 2 secara bertahap dan pengaruh stabilisasi terhadap motilitas setelah pembekuan sperma kauda epididimis kambing lokal.

Materi dan Metode

Pengambilan kauda epididimis

Dalam penelitian ini dipergunakan 16 testis kambing jantan lokal umur 1,5-2,5 tahun yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Sleman maupun tempat pemotongan tradisional di wilayah Yogyakarta. Proses pengambilan testis dilakukan segera setelah proses pemotongan dan ditransportasikan pada suhu ruang menuju laboratorium (Turri *et al.* 2014). Proses penimbangan

dan pengukuran testis dilakukan segera setelah sampai di laboratorium kemudian dilanjutkan dengan pengkoleksian kauda epididimis. Kauda epididimis dan sisi proksimal *ductus deferens* dipisahkan dari testis dan ditimbang kemudian dicacah dalam cawan petri menggunakan *scalpel*. Pencucian cacahan kauda epididimis dilakukan menggunakan 2.5 mL *modified phosphate buffer saline* (m-PBS) yang sudah dihangatkan 37°C kemudian epididimis dipindahkan ke cawan petri ke dua dan dicuci kembali menggunakan 2.5 mL media yang sama dengan cawan petri pertama. Spermatozoa yang diperoleh kemudian digabungkan dan diperiksa konsentrasi dan motilitas sperma kemudian dilanjutkan penambahan 5 mL pengencer 1 dan sentrifugasi pada 500g selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet sperma dipergunakan untuk proses selanjutnya.

Pembuatan pengencer

Pada penelitian ini digunakan pengencer 1 yang berisi *Tris (hidroxymethyl) aminomethan* 1.1 gram, asam sitrat 1.65 gram, fruktosa 2.0 gram, *streptomycin* 100.000 µg, *penicillin* 100.000 IU dan ditambah aquabides sampai volumenya mencapai 100 mL. Pengencer 1 tersebut dapat disimpan maksimal 4 hari dalam lemari es.

Bahan pengencer 2 dibuat setiap kali pembekuan dengan mencampur pengencer 1 sebanyak 75%, kuning telur sebanyak 20%, dan gliserol sebanyak 5% hingga homogen.

Kriopreservasi Sperma dengan Metode Bertahap dan Stabilisasi

Pelet sperma diencerkan dengan pengencer 1 untuk mendapatkan konsentrasi sebanyak 2×10^8 sel/ml dan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu: kelompok tunggal dan kelompok bertahap. Pada kelompok tunggal, penambahan pengencer 2 dilakukan dalam 1 tahap pemberian dengan perbandingan 1:1 (v/v.) Pada

kelompok bertahap, penambahan pengencer 2 dibagi dalam 4 tahap pemberian (14%, 19%, 27% dan 40% dari total volume pengencer 2 yang dibutuhkan) dengan interval 30 detik sehingga terjadi peningkatan tekanan osmotik yang sama di setiap penambahan (Setyawan *et al.* 2009).

Tiap kelompok (tunggal dan bertahap) dibagi lagi menjadi 2 kelompok pendinginan yaitu kelompok ekuilibrasi dan stabilisasi. Pada kelompok ekuilibrasi, pengemasan suspensi sperma menggunakan *straw* mini (0.25 cc) dilakukan pada suhu ruang dan diinkubasi dalam *refrigerator* bersuhu 4°C selama 2 jam. Pada kelompok stabilisasi, suspensi sperma dimasukkan ke dalam tabung 15 mL kemudian diinkubasi dalam *refrigerator* 4°C selama 2 jam demikian juga dengan *straw* mini kosong yang akan dipergunakan dan proses pengemasan dalam *straw* dilakukan pada suhu 4°C di akhir periode inkubasi. Setelah proses pendinginan selama 2 jam, seluruh *straw* diletakkan horisontal di rak dengan jarak 4 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -130°C) selama 10 menit dan selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu -196°C) untuk penyimpanan.

Proses Thawing

Semen yang telah dibekukan selama 24 jam selanjutnya di-thawing dengan menggunakan air yang bersuhu 37°C selama 30 detik. Evaluasi parameter motilitas sperma dilakukan pada suhu kamar di Laboratorium Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

Evaluasi Sperma

Evaluasi parameter motilitas sperma dikonsentrasikan pada penilaian pola gerakan sperma dan motilitas sperma. Penilaian pola gerakan sperma yang diperiksa dengan cara meneteskan 10 µL suspensi sperma pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya dilakukan penilaian terhadap

pola pergerakan sperma berdasarkan standar pemeriksaan sperma (Hafez, 2013) sebagai berikut:

- a. Nilai 0 jika tidak ada gerakan spermatozoa atau *immotile*
- b. Nilai 1 apabila gerakan spermatozoa berputar di tempat
- c. Nilai 2 jika gerakan spermatozoa berayun atau melingkar dan kurang dari 50 % spermatozoa bergerak progresif
- d. Nilai 3 apabila sebanyak 50 – 80 % spermatozoa bergerak progresif
- e. Nilai 4 jika sebanyak 90 % spermatozoa bergerak motil progresif
- f. Nilai 5 apabila gerakan spermatozoa progresif dan diperkirakan sebanyak 100% sperma motil aktif

Parameter berikutnya adalah motilitas setelah pembekuan yang diperiksa dengan cara meneteskan 10 µL suspensi sperma ke kaca obyek kemudian ditutup dengan *cover glass* kemudian diperiksa menggunakan stereo-mikroskop. Persentase spermatozoa yang bergerak progresif ke depan ditentukan secara subjektif pada 8 bidang pandang yang berbeda dengan pembesaran 400 kali (Toelihere, 1993). Angka yang diberikan berkisar antara 0% hingga 100% dengan skala 5%.

Analisis hasil

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk *mean* dan *standar error of mean (mean ± SEM)*. Data dianalisis menggunakan *student t-test*, korelasi dan *One way ANOVA* dilanjutkan *Tukey test* dengan angka kepercayaan $P < 0.05$ untuk menyatakan signifikansi perbedaan data statistik yang di

Hasil dan Pembahasan

Transportasi testis dari RPH Sleman maupun tempat pemotongan tradisional menuju laboratorium Reproduksi dan Obstetri, FKH, UGM memerlukan waktu maksimal 1 jam menggunakan kontainer pada suhu ruang. Hal tersebut dilakukan sesuai dengan Turri *et al.* (2014) yang melaporkan bahwa transportasi testis kambing dapat dilakukan pada suhu lingkungan hingga 48 jam *postmortem* tanpa menyebabkan penurunan kualitas sperma kauda epididimis yang signifikan. Pelaksanaan koleksi sperma dari kauda epididimis dilakukan di laboratorium dengan hasil pengukuran fisik dan konsentrasi sperma dapat dilihat pada Tabel 1. Rata rata panjang, lebar dan keliling testis kambing yang dipergunakan adalah 9.8 ± 0.1 cm, 4.8 ± 0.1 cm dan 14.3 ± 0.2 cm dengan rerata berat testis adalah 117.3 ± 4.6 g. Hasil pengukuran fisik testis pada penelitian ini termasuk ukuran normal seperti yang dilaporkan oleh Pathak *et al.* (2014) yang telah mengkonfirmasi data laporan sebelumnya dari beberapa ras, yaitu: panjang testis kambing dewasa adalah 5.2 – 10.0 cm dengan lebar antara 3.8 – 6.8 cm dan berat 57 – 145 g. Abu *et al.* (2016) menyebutkan bahwa berat testis pada kambing Red Sokoto adalah 56.82 ± 0.62 g sedangkan Noviana dkk. (2000) melaporkan hasil pengamatan ukuran testis pada 4 ekor kambing kacang sebagai berikut: rerata panjang testis 6.55 ± 0.8 cm, keliling testis 11.37 ± 1.33 cm dan berat testis sebesar 50.37 ± 3.15 g. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel yang dipergunakan pada penelitian ini berada dalam batas normal.

Kauda epididimis diketahui sebagai lokasi pendewasaan sperma dan organ yang berperan dalam

Tabel 1. Rerata data (*mean ± SEM*) dari seluruh sampel yang dipergunakan (n=16).

Panjang Testis (cm)	Lebar Testis (cm)	Keliling Testis (cm)	Berat Testis (g)	Berat Kauda Epididimis (g)	Konsentrasi Sperma ($10^9/ml$)
9.8 ± 0.1 (9.2 – 10.3)	4.8 ± 0.1 (3.9 – 5.0)	14.3 ± 0.2 (12.5 – 15.0)	117.3 ± 4.6 (95.0 – 160.0)	5.3 ± 0.2 (4.1 – 7.3)	1.1 ± 0.4 (0.4 – 2.6)

transpor dan konsentrasi sperma yang berbentuk membulat dengan otot yang dapat berkontraksi saat mendapatkan stimulasi (Cooper dan Yeung, 2006). Pada penelitian ini diperoleh rerata berat kauda epididimis sebesar 5.3 ± 0.2 g dengan konsentrasi sperma rerata sebanyak $1.1 \pm 0.4 \times 10^9/\text{mL}$ dengan sebaran $0.4 - 2.6 \times 10^9/\text{mL}$. Abba dan Igbokwe (2015) melaporkan bahwa konsentrasi sperma kauda epididimis pada kambing Sahel di Afrika diperoleh rerata $1.94 \pm 0.67 \times 10^9/\text{mL}$ dengan sebaran 1.12 - $4.66 \times 10^9/\text{mL}$. Sedangkan Ugwu (2009) menuliskan bahwa konsentrasi sperma yang diperoleh dari kauda epididimis kambing *West African Dwarf* adalah $1.46 \pm 0.26 \times 10^9/\text{mL}$ ($1.20 - 1.70 \times 10^9/\text{mL}$). Konsentrasi sperma kauda epididimis pada penelitian ini terlihat sedikit lebih rendah dari pada referensi tetapi sebaran data konsentrasi terlihat masih termasuk di dalam batas normal. Hal tersebut dimungkinkan karena perbedaan ras dan umur kambing pada saat pemeriksaan.

Karakteristik motilitas yang terlihat pada sperma hasil koleksi dari kauda epididimis diperoleh pola gerakan sperma termasuk dalam nilai 4 yang terlihat dominan sperma bergerak lurus dengan kecepatan sedang dan motilitas sperma diperoleh penilaian 89.2 ± 0.8 %. Nilai dari parameter karakteristik motilitas yang diperiksa tersebut termasuk baik jika dibandingkan dengan laporan Gautane *et al.* (2016) bahwa motilitas sperma kauda epididimis kambing lokal di Filipina berkisar antara 60-75% dan Abu *et al.* (2016) melaporkan 79.9 ± 0.7 % pada kambing Red Sokoto maupun Katanbafzadeh *et al.* (2015) yang menyatakan rerata motilitas kambing

lokal di Iran adalah 80.9 ± 1.5 %. Perera dan Ariyaratne (2013) juga melaporkan motilitas sperma kauda epididimis kambing lokal Sri Lanka memiliki rerata 75.5 ± 5.2 % yang berarti bahwa kualitas sperma kauda epididimis kambing lokal dalam penelitian ini tergolong baik.

Korelasi berat testis, berat kauda epididimis dan konsentrasi sperma

Hasil analisa korelasi antara berat testis dengan berat kauda epididimis menunjukkan adanya hubungan positif ($R^2=0.5518$) dengan nilai $P=0.0023$ seperti yang dapat dilihat Tabel 2. Abba dan Igbokwe (2015) melaporkan bahwa berat testis kambing Sahel memiliki nilai korelasi (R^2) sebesar 0.92 terhadap berat total epididimis. Noviana dkk. (2000) juga melaporkan bahwa berat testis kambing kacang berkorelasi dengan berat total epididimis sebesar $R^2 = 0.78$. Meskipun peneliti tersebut tidak melakukan analisa secara spesifik mengenai kauda epididimis namun kauda epididimis merupakan bagian terbesar dari keseluruhan epididimis sehingga dengan koefisien korelasi dan angka kepercayaan yang kuat tersebut maka dapat dimungkinkan bahwa berat testis juga memiliki korelasi terhadap berat kauda epididimis seperti hasil yang diperoleh pada penelitian ini.

Berat testis pada penelitian ini memiliki korelasi positif terhadap konsentrasi sperma kauda epididimis yaitu $R^2 = 0.3766$ dengan nilai $P=0.0257$. Selanjutnya diketahui bahwa berat kauda epididimis juga berkorelasi terhadap konsentrasi sperma kauda epididimis dengan nilai koefisien $R^2 = 0.3766$

Tabel 2. Korelasi antara berat testis, berat kauda epididimis dan konsentrasi sperma yang diperoleh.

Regresi dan korelasi	Nilai R^2	Nilai P	Signifikansi
Berat testis vs berat kauda epididimis	0.5518	0.0023	Signifikan
Berat testis vs konsentrasi sperma	0.3766	0.0257	Signifikan
berat kauda epididimis vs konsentrasi sperma	0.4783	0.0088	Signifikan

($P=0.0088$). Hasil tersebut bersesuaian dengan laporan Abba dan Igbokwe (2015) yang menyebutkan bahwa terdapat korelasi antara berat testis dan berat kauda epididimis terhadap jumlah sperma kauda epididimis pada kambing Sahel dengan koefisien korelasi berurutan sebagai berikut 0.36 dan 0.39. Hal tersebut mengindikasikan bahwa semakin berat testis seiring dengan penambahan berat kauda epididimis maka jumlah sperma yang dapat diperoleh juga semakin tinggi.

Pengaruh penambahan tunggal dan bertahap

Metode pembekuan yang dipergunakan pada penelitian ini adalah metode pembekuan lambat dengan 2 macam pengencer. Suspensi sperma yang diperoleh dari pencucian kauda epididimis dicuci dengan menambahkan pengencer 1 berupa Tris-sitrat-antibiotik sebanyak volume sperma yang diperoleh dan dilanjutkan sentrifugasi. Penambahan pengencer 1 pada pelet sperma dilakukan untuk memperoleh konsentrasi 2×10^8 sel/ml. Penambahan pengencer 2 sebanyak 1:1 (v/v) dilakukan dengan pelakuan tunggal (100%) dan bertahap (ditambahkan bertahap 14%, 19%, 27% dan 40% dari total volume pengencer 2 yang dibutuhkan). Pengenceran secara bertahap tersebut juga dilaporkan oleh Turri *et al.* (2014) dengan menggunakan 2 langkah yaitu pengencer 1 sebanyak 75% dari total volume yang dibutuhkan dan pengencer 2 sebanyak 25% dari total volume yang dibutuhkan. Akan tetapi prosedur bertahap tersebut kurang tepat karena

menurut Setyawan *et al.* (2009) bahwa penambahan krioprotektan dalam 1 kali pemberian menyebabkan kejutan tekanan osmotik yang berefek buruk terhadap membran dan kualitas sperma. Berdasarkan informasi tersebut maka metode pengenceran bertahap yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah 4 tahap yaitu setelah penambahan pengencer 1 untuk mencapai konsentrasi 2×10^8 sel/ml dilanjutkan penambahan pengencer 2 dengan volume yang sama (v/v) tetapi dibagi menjadi 4 tahap penambahan dengan persentase 14%, 19%, 27% dan 40% dari total pengencer 2 yang dibutuhkan (Setyawan *et al.*, 2009; Setyawan *et al.*, 2015).

Setelah proses pembekuan dan penyimpanan selama 24 jam dalam nitrogen cair selanjutnya dilakukan pemeriksaan parameter karakter motilitas setelah pembekuan. Pola gerakan individu sperma pada kedua perlakuan tidak ditemukan adanya perbedaan dan pergerakan sperma hanya berayun atau membentuk pola melengkung dan kurang dari 50% sperma bergerak progresif dengan nilai 2.0 ± 0.0 seperti yang dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil pemeriksaan motilitas setelah pembekuan menunjukkan bahwa perlakuan penambahan pengencer secara bertahap memberikan prosentase motilitas yang lebih tinggi secara nyata ($25.0 \pm 1.8\%$) dibandingkan dengan pemberian secara tunggal ($18.3 \pm 1.7\%$). Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan secara bertahap dapat mengurangi efek buruk perubahan tekanan osmotik yang ditimbulkan

Tabel 3. Rerata parameter motilitas setelah pembekuan sperma kauda epididimis kambing dengan metode tunggal dan bertahap.

Perlakuan	Pola Gerakan	Motilitas setelah pembekuan (%)
Metode penambahan pengencer 2:		
Tunggal	2.0 ± 0.0	18.3 ± 1.7^a
Bertahap	2.0 ± 0.0	25.0 ± 1.8^b
Metode pendinginan pra pembekuan:		
Equilibrasi	2.0 ± 0.0	17.5 ± 2.8^a
Stabilisasi	2.0 ± 0.0	24.2 ± 2.0^b

^{a,b} *superscript* yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$), $n = 6$.

oleh pengencer ke-2 terhadap membran sel sperma sehingga motilitas sperma setelah pembekuan dapat lebih terpelihara seperti yang dilaporkan Setyawan *et al.* (2009) pada sperma sapi. Selanjutnya Setyawan *et al.* (2015) juga menyampaikan bahwa desain prosentase volume yang ditambahkan secara bertahap mengikuti pola 14%, 19%, 27% dan 40% dari total volume pengencer 2 yang dibutuhkan memberikan efek yang baik terhadap sperma anjing yang memiliki sensitifitas tinggi terhadap kondisi tekanan osmotik selama proses pembekuan.

Pengaruh equilibrasi dan stabilisasi

Usaha peningkatan kualitas sperma kauda epididimis pada penelitian ini juga difokuskan pada proses pendinginan (*pre freezing*) dengan membandingkan sistem equilibrasi konvensional dengan sistem stabilisasi yang diadopsi dari Olaciregui *et al.* (2014) pada pembekuan sperma epididimis kuda. Sistem equilibrasi konvensional dilakukan dengan pengisian dan penyegelan *straw* pada suhu ruang sebelum diinkubasi dalam *refrigerator*. Sedangkan sistem stabilisasi dilakukan dengan menginkubasi suspensi sperma dalam tabung 15 mL dan *straw* kosong dalam *refrigerator* selama 2 jam kemudian dilanjutkan dengan pengisian dan penyegelan di suhu 4°C di akhir proses pendinginan. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa rerata gerakan massa dan pola gerakan sperma tidak memiliki perbedaan yang signifikan seperti disampaikan pada Tabel 3. Gerakan massa pada kelompok equilibrasi (1.0 ± 0.0) terlihat

lebih rendah dari pada kelompok stabilisasi (1.1 ± 0.1) tetapi perbedaan tersebut tidak signifikan saat diuji dengan *student t-test*. Demikian juga dengan pola gerakan yang menunjukkan skor yang sama antara ke dua kelompok perlakuan (2.0 ± 0.0).

Pada hasil pemeriksaan motilitas setelah pembekuan terlihat metode stabilisasi memiliki nilai yang lebih tinggi secara signifikan (24.2 ± 2.0 %) dibanding nilai motilitas pada kelompok equilibrasi (17.5 ± 2.8 %). Hasil tersebut sesuai dengan laporan Olaciregui *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa pendinginan yang lebih lambat dengan metode stabilisasi pada sperma epididimis kuda akan meningkatkan ketahanan sperma terhadap pembekuan. Selain itu, Ahmad *et al.* (2015) juga menyatakan bahwa tingkat pendinginan yang lambat (*slow cooling rate*) dapat meningkatkan kualitas sperma terutama mempertahankan motilitas pada ejakulat kambing jantan. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan pendinginan dengan metode stabilisasi yang menggunakan tabung reaksi 15 mL lebih lambat dari pada menggunakan *straw* mini (0.25 mL) dan pendinginan yang lebih lambat sebelum pembekuan tersebut dapat mempertahankan kualitas sperma dari pada pendinginan suspensi sperma dalam *straw*.

Pengaruh metode kombinasi

Untuk mengetahui pengaruh kombinasi penambahan pengencer ke-2 dan perlakuan pendinginan maka dilakukan modifikasi protokol dengan mengombinasikan keempat faktor tersebut

Tabel 4. Rerata parameter motilitas setelah pembekuan sperma kauda epididimis kambing dengan metode kombinasi.

Perlakuan	Pola Gerakan	Motilitas setelah pembekuan (%)
Tunggal dengan Equibrasi	2.0 ± 0.0	14.2 ± 2.0^a
Bertahap dengan Equibrasi	2.0 ± 0.0	15.8 ± 3.0^a
Tunggal dengan Stabilisasi	2.0 ± 0.0	15.8 ± 2.0^a
Bertahap dengan Stabilisasi	2.0 ± 0.0	21.7 ± 2.8^b

^{a,b} *superscript* yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), $n = 6$.

menjadi 4 kelompok dengan kombinasi sebagai berikut 1) tunggal dengan equilibrasi, 2) bertahap dengan equilibrasi, 3) tunggal dengan stabilisasi dan 4) bertahap dengan stabilisasi. Hasil kombinasi metode tersebut dapat dilihat pada Tabel 4, yaitu bahwa pola gerakan sperma menunjukkan data yang sama (2.0 ± 0.0) diantara ke empat kelompok yang diperiksa yaitu pola gerakan yang berayun atau melingkar dan kurang dari 50 % spermatozoa bergerak progresif.

Kombinasi metode bertahap dengan stabilisasi memberikan hasil motilitas setelah pembekuan yang lebih tinggi secara nyata (21.7 ± 2.8 %) dibanding kombinasi metode tunggal dengan equilibrasi (14.2 ± 2.0 %), bertahap dengan equilibrasi (15.8 ± 3.0 %) maupun metode tunggal dengan stabilisasi (15.8 ± 2.0 %). Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode stabilisasi dan penambahan secara bertahap dapat menghasilkan motilitas sperma setelah pembekuan yang lebih baik dibanding dengan keempat kombinasi yang lain. Hal ini disebabkan karena proses pendinginan yang lebih lambat pada stabilisasi dan perubahan tekanan osmotik yang terkontrol pada metode bertahap bersama sama melindungi kondisi sperma sehingga motilitas dapat dipertahankan (Olaciregui *et al.* 2014; Ahmad *et al.* 2015).

Parameter motilitas sperma setelah pembekuan terlihat cukup rendah, baik dari hasil metode penambahan pengencer 2 maupun penerapan metode stabilisasi dan equilibrasi. Hal tersebut dapat dimungkinkan disebabkan adanya kuning telur yang dapat mengganggu mekanisme pernafasan sperma (Salmani *et al.* 2014) dan adanya *lisolecthine* pada kuning telur dapat menjadi toksik bagi sperma kambing (Roof *et al.* 2012). Penurunan konsentrasi kuning telur pada penelitian selanjutnya dapat dipertimbangkan sebagai langkah untuk mengoptimalkan pembekuan sperma kauda epididimis kambing. Selain itu, rendahnya kualitas sperma setelah pembekuan dapat juga disebabkan penggunaan jenis

dan konsentrasi krioprotektan yang dapat menimbulkan efek buruk terhadap sperma (Rizal *et al.*, 2006) sehingga diperlukan modifikasi protokol dengan mengganti jenis krioprotektan maupun menurunkan konsentrasinya (Setyawan *et al.*, 2009). Penggunaan pengencer komersil juga dapat menjadi pilihan untuk meningkatkan kualitas sperma kauda epididimis kambing setelah pembekuan (Roof *et al.*, 2012).

Sperma kauda epididimis kambing dapat dikatakan sebagai sperma muda dan memiliki karakter motilitas tersendiri dibanding sperma dari hasil ejakulasi sehingga diperlukan protokol yang sesuai. Penggunaan metode stabilisasi memberikan hasil yang lebih baik dari pada metode equilibrasi dan metode penambahan pengencer 2 secara bertahap juga menunjukkan nilai motilitas yang lebih baik dari pada metode pemberian tunggal. Kombinasi metode stabilisasi dan penambahan bertahap memberikan persentasi motilitas yang lebih baik dari kombinasi metode yang lain. Usaha yang dapat dilakukan untuk mengoptimalkan pembekuan sperma kauda epididimis kambing adalah dengan mengurangi konsentrasi kuning telur maupun krioprotektan, mengganti jenis krioprotektan atau menggunakan pengencer komersial.

Kesimpulan

Kombinasi metode stabilisasi dan penambahan bertahap dapat menjadi metode alternatif dalam proses pembekuan sperma epididimis yang dapat mempertahankan persentasi motilitas setelah pembekuan.

Ucapan Terima Kasih

Dengan selesainya penelitian ini kami mengucapkan terimakasih yang sebesar besarnya kepada Direktorat Penelitian UGM yang telah menyediakan dana penelitian melalui kegiatan

Peningkatan Kapasitas Peneliti Dosen Muda Universitas Gadjah Mada Tahun Anggaran 2016 sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

Daftar Pustaka

- Abba, Y. and Igbokwe, I. O. (2015) Testicular and Related Size Evaluations in Nigerian Sahel Goats with Optimal Cauda Epididymal Sperm Reserve. *Veterinary Medicine International*. Article ID 357519. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/357519>
- Abu, A.H., Kisani, A.I. and Ahemen, T. (2016) Evaluation of sperm recovered after slaughter from cauda epididymides of red Sokoto bucks. *Veterinary World*. 9(12):1440-1444.
- Ahmad, M., Nasrullah, R. and Ahmad, N., (2015) Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. *Cryobiology*. 70:233–238.
- Cooper, T.G., and Yeung, C.H. (2006) *Sperm maturation in the human epididymis*. In *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. pp. 72–107, Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- Gautane, J.J., Balagan, E.J.Y., Ii, F.V. M., Ocampo, M.B., and Ocampo, L.C. (2016) Characteristics of epididymal sperm recovered from slaughterhouse derived testes of nondescript/native goats in the Philippines. *Journal of Agricultural Technology*. 12(2):215-228.
- Hafez, E. S. E. 2000. Anatomy of Male Reproduction. In: Hafez E. S. E. & B. Hafez. *Reproduction in Farm Animal*. 7thed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. Pp: 365-369
- Joseph, H.Y., and Hinton, B.T., (2009) Development and morphogenesis of the Wolffian / epididymal duct, more twists and turns. *Developmental Biology*. 325(1):6–14.
- Katanbafzadeh, H., Barati, F. and Tabandeh, M. (2015) A new approach for cryoprotectant-free freezing of goat epididymal spermatozoa. *Andrologia*. 47:1093–1097.
- Noviana, C., Boediono, A. dan Wresdiyati, T. (2000). Morfologi dan histomorfometri testis dan epididymis kambing kacang (*capra sp.*) Dan domba lokal (*ovis sp.*). *Media Veteriner*. 7(2): 12-16.
- Olaciregui, M., Gil, L., Montón, A., Luño, V., Jerez, R.A. and Martí, J.I. (2014) Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*. 68:91–95.
- Pathak, A., Katiyar, R.S., Sharma, D.N. and Farooqui, M.M. (2014) Postnatal Developmental Anatomy of Testes and Epididymis of Gaddi Goats. *Int. J. Morphol.* 32(4):1391-1398.
- Perera, K.U.E., and Ariyaratne, H.B.S. (2013) Cryopreservation of goat sperms collected from different regions of the epididymis. *Int. J. Sci. Res.* 2(7):36-38.
- Rizal, M. (2006) Fertilitas Semen Beku Hasil Ejakulasi dan Spermatozoa Beku Asal Cauda Epididymis Domba Garut. *Jurnal Sain Veteriner*. 24(1).
- Roof, D.J., Bowley, S., Price, L.L., and Matsas, D.J. (2012) Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*. 77: 412–420.
- Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M. and Sharafi, M. (2014) In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 68:276–280.
- Setyawan, E.E., Cooper, T.G., Widiasih, D.A., Junaidi, A. and Yeung, C.H. (2009) Effects of cryoprotectant treatments on bovine sperm function and osmolyte content. *Asian Journal of Andrology*. 11: 571–581.
- Setyawan, E.M.N., Kim, M.J., Oh, H.J., Kim, G.A., Jo, Y.K., Lee, S.H., Choi, Y.B., and Lee, B.C. (2015). Maintaining canine sperm function and osmolyte content with multistep freezing protocol and different cryoprotective agents. *Cryobiology*. 71: 344–349.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, T.M., Gandini, G., and Pizzi, F. (2014) Effect of testicle postmortem storage on goat frozen-thawed epididymal sperm quality as a tool to improve genebanking in local breeds. *Animal*. 8(3):440–447.
- Ugwu, S.O.C. (2009) Relationship between scrotal circumference, in situ testicular measurements and sperm reserves in the West African Dwarf Goats. *African Journal of Biotechnology* 8(7):1354–1357.