

PERUBAHAN VIABILITAS DAN SUBSELULER SPERMATOZOA DOMBA SETELAH PENGERINGBEKUAN

oleh : TAKDIR SAILI¹, I KETUT MUDITE ADNYANA², MOHAMAD AGUS SETIADI³,
SRIHADI AGUNGPRIYONO², ARIEF BOEDIONO²

¹Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232

²Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680

³Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680

ABSTRAK

Beberapa metode pengawetan spermatozoa telah diaplikasikan dengan keberhasilan yang berbeda-beda, antara lain metode pendinginan, pembekuan dan pengeringbekuan. Metode pengeringbekuan spermatozoa menawarkan alternatif penyimpanan spermatozoa dalam bentuk kering sehingga tidak dibutuhkan suplai nitrogen cair seperti yang dipersyaratkan pada metode pembekuan. Prosedur pengeringbekuan spermatozoa turut melibatkan proses pembekuan dan sublimasi yang pada akhirnya akan dihasilkan spermatozoa dalam bentuk kering. Proses pengeringbekuan berpotensi mengubah viabilitas dan bahkan dapat merusak membran plasma dan akrosom spermatozoa. Pada penelitian ini akan diterapkan metode pewarnaan untuk mempelajari perubahan viabilitas spermatozoa dan *scanning electron microscope* untuk melihat perubahan subseluler spermatozoa domba hasil pengeringbekuan. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa semua spermatozoa terbukti mati setelah dilakukan evaluasi menggunakan metode pewarnaan. Demikian halnya dengan hasil pengamatan subseluler dengan menggunakan *scanning electron microscope* membuktikan bahwa membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa domba mengalami kerusakan setelah proses pengeringbekuan.

ABSTRACT

Several methods have been applied to preserve spermatozoa with various successful, i.e. cooling method, freezing method, and freeze-drying method. Freeze-drying method of spermatozoa over a possibility to preserve spermatozoa in a dry state in which liquid nitrogen is not necessary as it is required in storing frozen spermatozoa. Freeze drying procedures of spermatozoa included freezing and sublimation processes which in turn resulted in freeze-dried spermatozoa. The process of freeze drying caused detrimental effect on plasma membrane and acrosomal cap of the spermatozoa, therefore, in this experiment viability and subcellular changes on freeze-dried ram spermatozoa were evaluated using staining method and scanning electron microscope observation, respectively. The results revealed that all freeze-dried spermatozoa were dead following evaluation using eosin staining and Hoechst-propidium iodide staining methods. Moreover, plasma membrane and acrosome cap of freeze-dried ram spermatozoa was disrupted observed using scanning electron microscope.

Key words : *freeze drying, ram spermatozoa, plasma membrane, acrosome cap*

PENDAHULUAN

Pengawetan spermatozoa merupakan salah satu cara yang ditempuh dalam bidang reproduksi untuk menjamin ketersediaan sumber gamet jantan pada setiap saat diperlukan untuk tujuan fertilisasi oosit baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Beberapa metode pengawetan telah diterapkan pada spermatozoa baik dengan cara pendinginan, pembekuan maupun pengeringbekuan. Pengawetan spermatozoa dengan cara pendinginan hanya menghasilkan spermatozoa dengan waktu simpan yang relatif singkat dibanding pengawetan spermatozoa dengan cara pembekuan atau pengeringbekuan. Hal ini disebabkan oleh lingkungan tempat penyimpanan spermatozoa dengan cara pendinginan masih memungkinkan spermatozoa melangsungkan proses metabolisme yang pada gilirannya produk metabolisme tersebut berupa asam laktat akan bersifat toksik terhadap spermatozoa itu sendiri. Selain itu, pada metode pendinginan tidak digunakan zat krioprotektan yang berfungsi melindungi spermatozoa dari pengaruh dingin yang berlebihan. Sebaliknya pada metode pembekuan, spermatozoa dipapar pada lingkungan yang sangat dingin sehingga menjadi beku. Kondisi ini tidak memungkinkan bagi spermatozoa untuk melakukan aktivitas metabolisme dengan baik bahkan bisa berhenti sama sekali sehingga spermatozoa aman dari pengaruh toksik produk metabolisme. Untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh dingin yang berlebihan maka pada metode ini digunakan zat krioprotektan. Melalui metode ini spermatozoa dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama tetapi membutuhkan suplai nitrogen cair yang terus menerus selama penyimpanan untuk menjaga kestabilan suhu selama penyimpanan.

Metode pengeringbekuan menawarkan alternatif lain untuk menyimpan spermatozoa dalam bentuk kering sehingga proses penyimpanannya dapat dilakukan pada suhu kamar atau pada lemari es yang tidak memerlukan suplai nitrogen. Istilah “pengeringbekuan” merupakan terjemahan dari kata asing “*freeze-drying*” yang kemudian didefinisikan sebagai suatu metode pengawetan keterhidupan spesimen biologi dengan dehidrasi dalam keadaan beku di bawah keadaan hampa udara (Rifai 2002). Lebih luas istilah ini digunakan pula untuk menyebut proses pembuatan kemasan materi biologi, farmasi, makanan dan beberapa penyedap rasa dalam kemasan kering (Commercial Freeze Dry 2003) dan selanjutnya juga dipakai pada bidang pengawetan spermatozoa.

Pada proses pengeringbekuan, spermatozoa terlebih dahulu dipapar pada nitrogen cair dengan suhu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk mendapatkan sediaan spermatozoa dalam keadaan

beku. Selanjutnya dilakukan sublimasi untuk menguapkan fase air yang telah membeku sehingga pada akhirnya akan didapatkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering. Kedua proses ini berpotensi dapat mengubah morfologi spermatozoa bahkan mungkin dapat menghentikan fungsi biologis spermatozoa tersebut. Weitze dan Petzoldt (1992) melaporkan bahwa pendinginan dan pembekuan (Bag *et al.* 2002) dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan membran akrosom spermatozoa. Kerusakan membran ini pada gilirannya akan menurunkan viabilitas spermatozoa bahkan dapat menyebabkan kematian bagi spermatozoa. Namun demikian, dengan menggunakan metode *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI), spermatozoa yang telah mengalami kerusakan membran plasma dan akrosom masih mempunyai kemampuan untuk membuahi oosit.

Informasi tentang pengaruh pengeringbekuan terhadap perubahan viabilitas dan subseluler spermatozoa sangat dibutuhkan untuk mengetahui kondisi membran plasma dan akrosom spermatozoa hasil pengeringbekuan. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan evaluasi perubahan viabilitas dan subseluler spermatozoa domba setelah proses pengeringbekuan dan penyimpanan di dalam lemari es (3-5 °C) menggunakan teknik pewarnaan dan pengamatan melalui *scanning electron microscope* (SEM).

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Spermatozoa

Semen segar ditampung dari seekor domba jantan lokal dengan menggunakan vagina buatan. Selanjutnya semen tersebut diproses menggunakan metode pengeringbekuan untuk menghasilkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering. Metode pengeringbekuan spermatozoa yang digunakan pada penelitian ini diadopsi dari Kaneko *et al.* (2003) dengan sedikit modifikasi. Di dalam proses pengeringbekuan digunakan medium *ethylene glycol-bis [beta-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) yang mengandung EGTA 50 mM. Secara jelas prosedur pengeringbekuan dapat diuraikan sebagai berikut. Sejumlah 50 µl semen domba dengan konsentrasi 3×10^9 spermatozoa/ml dimasukkan ke dalam tube 1.5 ml kemudian ditambahkan medium pelarut EGTA dengan pH 8.0 sebanyak 1.3 ml. Selanjutnya campuran semen tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Fraksi spermatozoa yang berada di bagian atas tube diambil secara perlahan-lahan dan dipindahkan masing-masing sebanyak 100 µl ke dalam tube berpenutup ulir 1.5 ml (*Cryo-tube, Greiner*). Tube tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair hingga proses pengeringbekuan

dimulai. Proses pengeringbekuan diawali dengan pemasangan tube ke alat pengeringbekuan, selanjutnya mesin dijalankan dan proses pengeringbekuan berjalan hingga terbentuk tepung spermatozoa (spermatozoa kering) di dalam tube tersebut. Tube selanjutnya dilepas dari mesin pengeringbekuan, ditutup rapat, divakum dengan menggunakan syringe 10 ml dan disimpan di dalam lemari es (3-5 °C) atau suhu kamar (27-30 °C) hingga digunakan.

Evaluasi Viabilitas Spermatozoa Hasil Pengeringbekuan

Uji viabilitas sel spermatozoa bertujuan untuk mengetahui status hidup/mati sel spermatozoa menggunakan prosedur pewarnaan *Hoechst-propidium iodide* (Hoechst-PI) menurut Saha *et al.* (1996) dengan beberapa modifikasi. Sampel spermatozoa sebanyak 100 µl diinkubasi di dalam pewarna Hoechst-PI (10µg/ml) selama 30 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya sampel spermatozoa diteteskan di atas gelas obyek dan diperiksa di bawah mikroskop fluoresens dengan filter V-2A (Ex = 380-420, DM = 430 dan BA = 450) (Nikon Eclipse E600, Japan). Spermatozoa dengan kepala yang berwarna merah digolongkan ke dalam spermatozoa mati, sedangkan spermatozoa dengan kepala ungu (violet) digolongkan ke dalam spermatozoa hidup. Jumlah spermatozoa yang diamati pada setiap perlakuan adalah 300 spermatozoa. Sebagai pembanding juga dilakukan evaluasi viabilitas spermatozoa menggunakan prosedur pewarnaan eosin B.

Evaluasi perubahan subseluler spermatozoa dilakukan dengan menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) sesuai prosedur yang dikemukakan oleh Liu *et al.* (2004) dengan sedikit modifikasi. Proses penyiapan sampel spermatozoa secara jelas dapat dikemukakan sebagai berikut. Sebanyak 5µl sampel semen dengan konsentrasi 5×10^5 /ml diteteskan pada potongan gelas obyek berukuran 0.25 cm² yang terlebih dahulu dilapisi dengan neofren 0.2% sebagai bahan perekatnya. Selanjutnya sampel difiksasi di dalam larutan *glutaraldehyde* 2.5% dan dicuci dengan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS). Sampel kemudian direndam di dalam larutan *tannic acid* 2% selama satu jam dan dicuci terlebih dahulu dengan larutan PBS hingga jernih sebelum ditetesi dengan *osmium tetroxyde* 1%. Pencucian sampel kembali dilakukan dengan menggunakan larutan PBS sebelum perlakuan dehidrasi tahap pertama dengan menggunakan alkohol bertingkat (70-100%). Dehidrasi sampel tahap kedua dilakukan dengan menggunakan *t*-butanol dan proses pengeringan sampel dilakukan dengan menggunakan alat pengeringbekuan (VFD-21S *t*-BuOH Freezedryer). Tahap akhir

penyiapan sampel spermatozoa untuk pengamatan menggunakan SEM adalah proses *coating* yang menggunakan logam platinum pada alat *coating* (Eiko IB-3 Ion Coater). Evaluasi spermatozoa dilakukan dengan cara mengamati perubahan membran plasma dan akrosom spermatozoa pada SEM.

Analisis Data

Data tentang viabilitas dan perubahan subseluler spermatozoa disajikan dalam bentuk gambar dan selanjutnya diulas secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

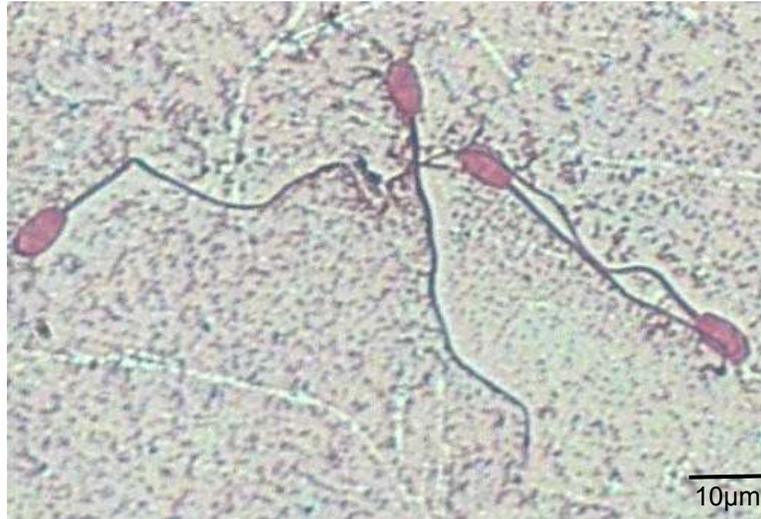
Viabilitas dan perubahan subseluler spermatozoa setelah pengeringbekuan

Viabilitas spermatozoa hasil pengeringbekuan dievaluasi dengan menggunakan pewarna eosin B 2% dan pewarna *Hoechst-propidium iodide* (Hoechst-PI). *Hoechst* merupakan pewarna inti sel yang terikat baik pada pasangan basa adenin-timin (AT) dan dapat menembus membran sel hidup, sedangkan PI hanya dapat menembus membran sel yang telah mati (Comet Assay Interest Group 2002). Spermatozoa yang terwarnai oleh *Hoechst* akan berwarna biru, sedangkan spermatozoa yang terwarnai oleh PI akan berwarna merah. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa 100% spermatozoa hasil pengeringbekuan pada setiap perlakuan berwarna merah atau terbukti mati setelah diwarnai dengan pewarna eosin B 2% (Gambar 1) atau pewarna Hoechst-PI (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa hasil pengeringbekuan telah mengalami kerusakan membran plasma sehingga pewarna PI dapat berdifusi ke dalam inti sel dan memunculkan spektrum warna merah pada saat pengamatan di bawah mikroskop fluoresens.

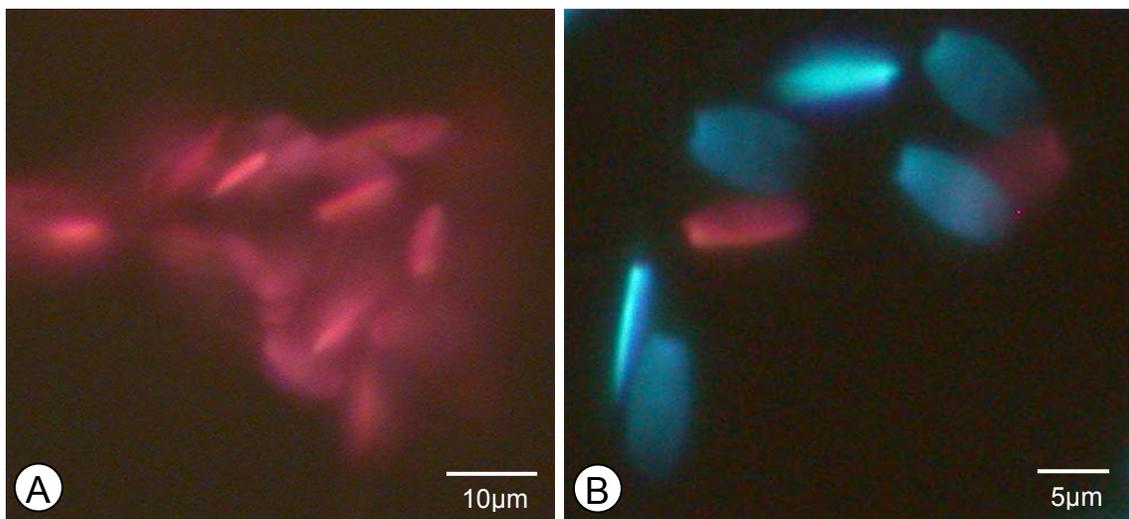
Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan Kaneko *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa semua spermatozoa hasil pengeringbekuan terbukti mati setelah dilakukan pewarnaan karena membran plasmanya mengalami kerusakan. Sedangkan Wakayama *et al.* (1998) menyatakan bahwa spermatozoa mencit yang dipapar pada suhu -196 °C (nitrogen cair) tanpa krioprotektan semua terbukti mati setelah dievaluasi menggunakan teknik pewarnaan.

Beberapa perlakuan yang menyebabkan rusaknya membran plasma spermatozoa seperti pemotongan ekor (Boediono 2001), pemisahan kepala dan ekor spermatozoa dengan metode sonikasi (Said & Niwa 2004; Said *et al.* 2003) dan pembekuan tanpa krioprotektan (Saili & Said 2005; Ward *et al.* 2003) akan berakibat pada kematian

spermatozoa. Hal ini dapat dibuktikan melalui pewarnaan dengan eosin B yang memperlihatkan bahwa spermatozoa yang mati akan terwarnai karena membran plasmanya telah rusak sehingga zat warna dapat masuk ke dalam sel melewati membran sedangkan spermatozoa yang hidup tidak dapat dilewati oleh zat warna (Liu & Foote 1998).



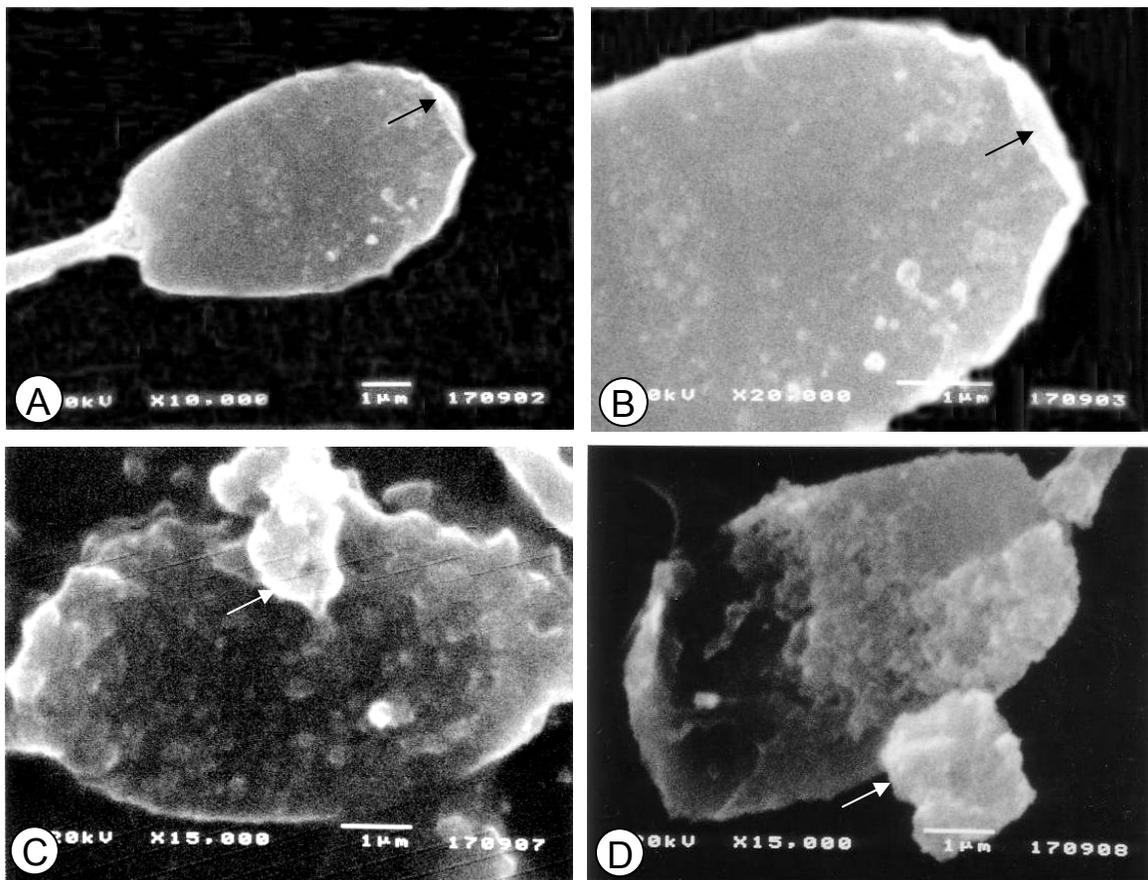
Gambar 1 Spermatozoa hasil pengeringbekuan dengan metode pewarnaan eosin B 2%. Warna merah pada kepala spermatozoa menunjukkan spermatozoa mati



Gambar 2 Spermatozoa dengan metode pewarnaan *Hoechst-propidium iodide* (Hoechst-PI). Spermatozoa hasil pengeringbekuan semua menyerap warna merah (PI) menunjukkan spermatozoa mati (A), spermatozoa segar yang hidup menyerap warna biru (Hoechst) sedangkan yang mati menyerap warna merah (B).

Evaluasi perubahan subseluler spermatozoa hasil pengeringbekuan meliputi perubahan permukaan membran plasma dan akrosom spermatozoa menggunakan *scanning electron microscope* (SEM). *Scanning electron microscope* merupakan mikroskop elektron yang dapat memberikan gambaran detail permukaan obyek yang diamati dengan pembesaran 10 kali sampai sejuta kali dari obyek aslinya (Noor 2001).

Hasil evaluasi subseluler spermatozoa mengungkapkan bahwa spermatozoa hasil pengeringbekuan mempunyai struktur permukaan yang tidak beraturan karena sebagian besar membran plasma dan tudung akrosomnya telah rusak (Gambar 3c dan 3d). Berbeda halnya dengan spermatozoa segar yang masih memperlihatkan batas membran yang jelas pada permukaan spermatozoa (Gambar 3a dan 3b). Pemaparan spermatozoa pada suhu yang ekstrim saat pembekuan di dalam nitrogen cair berpotensi merusak struktur membran plasma spermatozoa.



Gambar 3 Spermatozoa dengan *scanning electron microscope* (SEM). Spermatozoa segar dengan batas permukaan membran yang jelas, tanda panah (A dan B) dan spermatozoa setelah pengeringbekuan dengan permukaan membran yang rusak, tanda panah (C dan D)

Tahap pembekuan spermatozoa di dalam prosedur pengeringbekuan dilakukan dengan cara memasukkan secara langsung kemasan spermatozoa ke dalam nitrogen cair. Prosedur ini mirip dengan tahap pembekuan pada metode vitrifikasi. Pada prosedur vitrifikasi, kombinasi antara konsentrasi zat krioprotektan yang tinggi dengan kecepatan pendinginan menyebabkan tidak terbentuknya kristal es sebagai gejala umum yang terjadi pada proses pembekuan yang dapat merusak sel. Sedangkan pada prosedur pengeringbekuan tidak digunakan zat krioprotektan sehingga potensi kerusakan membran akibat pembentukan kristal es akan muncul. Walaupun pada penelitian ini digunakan EGTA yang mengandung *ethylene glycol* yang berfungsi baik sebagai zat krioprotektan intraseluler, tetapi konsentrasinya sangat rendah (50 mM) dibandingkan dengan konsentrasi zat krioprotektan pada prosedur vitrifikasi (5-8M) (Reinoud *et al.* 1995) sehingga tidak mampu memberikan perlindungan kepada membran plasma dan akrosom spermatozoa. Penggunaan EGTA pada metode ini dimaksudkan untuk melindungi keutuhan DNA spermatozoa hasil pengeringbekuan karena EGTA mampu menekan fungsi kation divalen seperti kalsium (Ca^{2+}) dan magnesium (Mg^{2+}) yang mendukung kerja enzim endonuklease, sehingga proses pemutusan ikatan fosfodiester pada tubuh DNA oleh enzim endonuklease tidak terjadi (Clark & Eichhorn 1974; Kusakabe *et al.* 2001). Gugus *tetra asetic acid* pada lengan struktur bangun EGTA mempunyai afinitas yang kuat untuk mengikat ion-ion bebas terutama ion Ca^{2+} (Anonymous 2005).

Selain itu, Parks dan Graham (1992) melaporkan bahwa kejutan dingin dapat menyebabkan kerusakan pada fosfolipid membran spermatozoa. Kedua hal inilah diduga sebagai penyebab utama kerusakan membran plasma dan akrosom pada prosedur pengeringbekuan.

Demikian halnya pada tahap sublimasi, kristal es yang berikatan dengan permukaan spermatozoa akan diuapkan dengan mengalirkan udara bertekanan negatif (67-500 milli Torr) untuk mendapatkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering. Proses sublimasi ini berpotensi besar merusak struktur permukaan membran plasma dan akrosom spermatozoa. Perry (1995) mengemukakan bahwa energi sublimasi yang merupakan kombinasi panas dan tekanan negatif harus dapat mengalir dengan baik di atas maupun di bawah permukaan sel agar penguapan kristal es dapat berlangsung. Energi sublimasi tersebut harus dikontrol dengan baik agar uap yang dihasilkan dapat hilang secepatnya sehingga tidak menyebabkan kerusakan struktural pada sel.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Semua spermatozoa hasil pengeringeukan tidak hidup lagi yang ditunjukkan oleh terserapnya warna merah pada keseluruhan tubuh spermatozoa baik melalui pewarnaan eosin maupun pewarnaan *Hoechst-propidium iodide*.
2. Membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa mengalami kerusakan setelah pengeringbekuan yang ditunjukkan oleh gambar yang dihasilkan dari pengamatan melalui *scanning electron microscope*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2005. The differences between EDTA and EGTA. <http://www.madsci.org/posts/archives/2001-02/983222932.Bc.r.html>. [30 Des 2005].
- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. 2002. Effect of freezing temperature, at which straw were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 72:175-183.
- Boediono A. 2001. Sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and oocyte activation improves early development of microfertilized goat oocytes. *Reprotech* 1:29-34.
- Clark P, Eichhorn GL. 1974. A predictable modification of enzyme specificity. Selective alteration of DNA bases by metal ions to promote cleavage specificity by deoxyribonuclease. *Biochemistry* 13:5098-5102.
- Comet Assay Interest Group. 2002. Staining. <http://www.geocities.com/cometassay/stains.htm>. [19 Agu 2002].
- Commercial Freeze Dry. 2003. The freeze-drying process. <http://www.commercialfreezedry.co.uk/process.html>. [9 Juni 2003].
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. 2003. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 68:136-139.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. 2001. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *PNAS* 98:13501-13506.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X. 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 70:1776-81.
- Liu Z, Foote RH. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci* 81:1868-1873.
- Noor RR. 2001. *Scanning Electron Microscope*. Bogor: Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian.
- Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222.

- Perry SF. 1995. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. Di dalam: Day JG, McLellan MR, editor. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Totowa New Jersey: Humana Press. hlm. 21-30.
- Reinoud PJ, Uragami A, Sakai A, Iren FV. 1995. Vitrification of plant cell suspensions. Di dalam: Day JG, McLellan MR, editor. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Totowa New Jersey: Humana Press. hlm. 113-120.
- Rifai MA. 2002. *Kamus Biologi*. Ed.ke-2. Jakarta: Balai Pustaka.
- Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. 1996. Viability of bovine blastocyst obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology* 46:331-343.
- Said S, Niwa K. 2004. Pembuahan dan perkembangan oosit tikus setelah disuntik spermatozoa mati. *Hayati* 11:135-138.
- Said S, Saili T, Tappa B. 2003. Pengaktifan dan pembuahan oosit tikus setelah disuntik dengan kepala spermatozoa. *Hayati* 10:96-99.
- Saili T, Said S. 2005. The ability of rat cauda epididymal spermatozoa cryopreserved without cryoprotectant in liquid nitrogen to induce pronucleus formation. *J Vet* 6:78-84.
- Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. 1998. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* 112:11-17.
- Weitze KF, Petzoldt R. 1992. Preservation of semen. *Anim Reprod Sci* 28:229-235.