

Penelitian

Daya Fertilisasi Spermatozoa Kauda Epididimis Domba dengan atau tanpa *Swim Up* sebelum Fertilisasi

(*In Vitro Fertility of Post-Thawed Epididymal Ram Spermatozoa with or without Swim Up before Fertilization*)

Nur'aisyah Amrah Safitri¹, Ni Wayan Kurniani Karja^{2*}, Mohamad Agus Setiadi², Mokhamad Fahrudin³

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor; Jln. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680, Indonesia

*Penulis untuk korespondensi : karjanwk13@gmail.com

Diterima 23 Agustus 2016, Disetujui 23 November 2016

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi penggunaan metode *swim up* untuk persiapan spermatozoa sebelum fertilisasi terhadap tingkat fertilisasi *in vitro* spermatozoa kauda epididimis pasca penyimpanan selama 48 jam. Kauda epididimis domba disimpan pada suhu 4 °C selama 0 hari (H-0), 1 hari (H-1) dan 2 hari (H-2), kemudian spermatozoa dikoleksi dan dibekukan. Spermatozoa ejakulat beku digunakan sebagai kontrol. Oosit yang telah matang difertilisasi secara *in vitro* dengan spermatozoa asal kauda epididimis pasca penyimpanan dan ejakulat menggunakan metode persiapan spermatozoa dengan dan tanpa *swim up*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa asal kauda epididimis yang dikoleksi segera setelah kematian hewan (H-0) memiliki kemampuan yang sama dengan spermatozoa ejakulat ($P>0,05$). Tingkat fertilisasi spermatozoa kauda epididimis pasca penyimpanan selama 2 hari mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu simpan. Penggunaan metode *swim up* dan tanpa *swim up* menunjukkan kemampuan fertilisasi yang sama pada spermatozoa ejakulat dan spermatozoa kauda epididimis yang disimpan. Dapat disimpulkan bahwa metode *swim up* tidak berpengaruh terhadap tingkat fertilisasi *in vitro* spermatozoa asal kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4 °C selama 2 hari. Kemampuan fertilisasi spermatozoa asal kauda epididimis domba yang disimpan pada suhu 4 °C mengalami penurunan sampai hari kedua, namun spermatozoa tersebut masih mampu membuahi oosit secara *in vitro*.

Kata kunci: domba, fertilisasi *in vitro*, kauda epididimis, penyimpanan, *swim up*

ABSTRACT

This aim of the present study was to evaluate the using of swim up method for sperm preparation before *in vitro* fertilization of epididymidal spermatozoa after storage for 48h. Epididymides were stored at 4 °C for 0 day (H-0), 1 day (H-1) and 2 days (H-2), afterward semen were collected and frozen. Ejaculated semen was used as control group. Matured oocytes were then *in vitro* fertilized by frozen-thawed spermatozoa of each group experiments and ejaculated semen using preparation methods with and without *swim up*. These results show *in vitro* fertilization ability of cauda epididymal ram spermatozoa were collected immediately after the animal's death (H-0) is similar to ejaculated spermatozoa ($P>0.05$). The fertilizing ability of cauda epididymal after storage for 2 days was declined gradually of increased storage time. There was similar ability in fertilization rate of stored cauda epididymal spermatozoa between with or without swim up method ($P>0.05$). It can be concluded that method of swim up and without swim up were similar effect on the rate of *in vitro* fertilization epididymidal spermatozoa that stored at 4 °C for 2 days. The fertilizing ability spermatozoa collected from cauda epididymides were stored at 4 °C gradually decreased as the storage period was prolonged, however it still able to be fertilize oocytes *in vitro*.

Keywords: cauda epididymis, *in vitro* fertilization, sheep, storage, swim up

PENDAHULUAN

Materi genetik dari hewan yang memiliki nilai genetik unggul, hewan yang populasinya semakin menurun, satwa liar atau hewan yang dilindungi, bisa punah kapan saja akibat kematian yang tidak terduga. Penyelamatan materi genetik dari hewan jantan yang telah mati dapat dilakukan dengan pemanfaatan spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis hewan tersebut (Kaabi et al., 2003). Koleksi dan kriopreservasi spermatozoa dari kauda epididimis dapat dijadikan salah satu cara penyelamatan materi genetik dari hewan yang telah mati. Koleksi semen asal kauda epididimis dari rumah potong hewan (RPH) merupakan alternatif yang cepat dan murah serta kauda epididimis memiliki jumlah spermatozoa hidup yang cukup tinggi (Ehling et al., 2006)

Spermatozoa pada kauda epididimis telah melewati proses pematangan di bagian kaput dan korpus epididimis, serta sudah memiliki kemampuan bergerak (motil) yang sama dengan spermatozoa dari ejakulat (Axner et al., 1998). Spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis memiliki motilitas, integritas membran plasma dan morfologi yang tidak berbeda dengan spermatozoa dari ejakulat baik sebelum atau setelah dikriopreservasi (Tebet et al., 2006) serta masih memiliki kemampuan untuk membuahi oosit secara *in vitro* dan menghasilkan keturunan (Jishage et al., 1997; Songsasen et al., 1998).

Preservasi spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4-5 °C dapat digunakan untuk teknologi reproduksi berbantuan dan fertilisasi *in vitro* ketika spermatozoa tersebut tidak dapat segera dikoleksi (Hishinuma et al., 2003). Penyimpanan kauda epididimis pada suhu 5 °C mampu mencegah penurunan motilitas spermatozoa secara cepat seperti yang telah dilaporkan pada domba (Kaabi et al., 2003), rusa merah (Soler et al., 2003), dan kuda (Vieira et al., 2012). Spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis dari hewan mati berhasil dikriopreservasi dan dapat digunakan pada produksi embrio *in vitro* (Martins et al., 2007). Beberapa penelitian melaporkan mengenai kemampuan fertilisasi *in vitro* dari spermatozoa kauda epididimis pasca penyimpanan yang dikriopreservasi seperti pada babi (Kikuchi et al., 1998), kambing (Blash et al., 2000), sapi (Martins et al., 2009), domba Manchega hitam (Garcia-Alvarez et al., 2009). Di sisi lain, walaupun spermatozoa yang motil dapat dikoleksi dari epididimis 96 jam setelah kematian domba akan tetapi motilitas dan daya fertilisasinya terhadap oosit secara *in vitro* menu-

run seiring dengan lamanya periode penyimpanan epididimis (Karja et al., 2013). Oleh karena itu diperlukan suatu metode pemisahan spermatozoa yang hidup untuk meningkatkan persentase spermatozoa motil.

Berbagai metode seleksi spermatozoa dilakukan untuk meningkatkan kualitas spermatozoa dalam fertilisasi *in vitro*, salah satunya dengan penggunaan metode swim up. Swim up merupakan metode yang murah dan mudah dalam pelaksanaannya (Henkel & Schill, 2003) dimana metode ini menyeleksi spermatozoa dengan motilitas tinggi yang dapat mencapai permukaan media setelah diinkubasi (Wolf et al., 2008). Metode swim up dilakukan untuk memisahkan spermatozoa motil dari spermatozoa yang tidak motil, spermatozoa mati, serta menginisiasi kapasitas (Centola et al., 1998). Penerapan metode swim up diharapkan mampu menjadi salah satu metode untuk meningkatkan kemampuan fertilisasi *in vitro* spermatozoa beku dari kauda epididimis pasca penyimpanan sampai hari kedua.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi penggunaan metode swim up untuk persiapan spermatozoa sebelum fertilisasi terhadap tingkat fertilisasi *in vitro* spermatozoa kauda epididimis pasca penyimpanan selama 48 jam. Sebagai kontrol dalam penelitian ini digunakan spermatozoa beku dari ejakulat domba.

BAHAN DAN METODE

Koleksi dan Kriopreservasi Spermatozoa dari Kauda Epididimis

Spermatozoa asal kauda epididimis diperoleh dari testis domba yang diperoleh dari rumah pemotongan hewan (RPH). Kauda epididimis lalu ditempatkan dalam plastik ziplock pada suhu ruang dan dibawa ke laboratorium. Kauda epididimis kemudian disimpan pada refrigerator dengan suhu 4 °C selama nol hari (H-0), satu hari (H-1) dan dua hari (H-2). Pada setiap akhir periode penyimpanan, spermatozoa dikoleksi dari kauda epididimis dengan cara penyayatan. Hanya sampel yang mempunyai motilitas lebih dari 70% yang digunakan dalam penelitian ini. Sebagai kontrol perlakuan, digunakan spermatozoa ejakulat beku yang diperoleh dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Lembang, Bandung.

Kriopreservasi spermatozoa dilakukan dengan metode yang dilaporkan oleh Karja et al. (2013). Segera setelah koleksi, spermatozoa diencerkan dengan media Niwa and Sasaki Freezing (NSF) I, lalu

dilakukan equilibrasi pada suhu 4 °C selama 2 jam, kemudian ditambahkan media NSF II dan diekuilibrasi kembali pada suhu yang sama selama 5 menit. Perbandingan penambahan media NSF I dengan NSF II sebesar 1:1 dengan konsentrasi akhir spermatozoa setelah penambahan media NSF sebesar 100×10^6 spermatozoa/ml dan konsentrasi akhir gliserol sebesar 3%. Spermatozoa segera dimasukkan ke dalam straw berukuran 0,25 ml (IMV, France), kemudian diletakkan pada sebuah styrofoam plate dalam uap nitrogen cair selama 20 menit (kurang lebih 4 cm dari permukaan nitrogen cair) dan kemudian segera dimasukkan dalam kontainer nitrogen cair untuk penyimpanan sebelum digunakan.

Fertilisasi Oosit *in Vitro*

Koleksi dan Maturasi Oosit

Ovarium domba diperoleh dari rumah potong hewan (RPH). Oosit dikoleksi dengan mencacah (slicing) bagian korteks ovarium menggunakan scalpel ukuran 20. Koleksi oosit dilakukan menggunakan larutan dulbecco's Phosphate Buffer Solution (dPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) disuplementasi dengan 0,3% Bovine Serum Albumine (BSA; Sigma-Aldrich. Inc, A-7030), 100 IU/ml penisilin (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA) dan 0,1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich. Inc, S-9137, USA) yang telah diekuilibrasi terlebih dahulu di dalam inkubator. Oosit yang digunakan adalah oosit dengan sitoplasma yang homogen serta memiliki lebih dari beberapa lapis sel-sel kumulus yang kompak (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002). Selanjutnya oosit dimatangkan dalam media TCM-199 (Sigma, USA) yang disuplementasi dengan 0,3% BSA, 10 µg/ml Follicle Stimulating Hormone (FSH; Teikokuzoki, Tokyo, Japan), 10 IU/ml human Chorionic Gonadotrophin (hCG; Ktoritsu Seiyaku, Japan), 1 µg/ml estradiol (Intervet international B.V Boxmeer-Holland) dan 50 µg/ml gentamycin (Sigma-Aldrich. Inc, P-4678, USA). Pematangan oosit dilakukan dalam media maturasi dalam bentuk drop masing-masing 100 µl untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan mineral oil (Sigma-Aldrich. Inc, M-8410, USA) dalam inkubator CO₂ 5%, 39 °C selama 24 jam.

Fertilisasi *In Vitro*

Persiapan spermatozoa untuk fertilisasi dilakukan dengan dan tanpa swim up. Semen beku di-thawing dalam water bath pada temperatur 35 °C selama 30 detik. Persiapan spermatozoa dengan metode swim up, setelah thawing spermatozoa

diinkubasi dalam media TALP (Tyroide Albumin Lactate Pyruvate) yang disuplementasi dengan glukosa dan BSA selama 15 menit sebelum disentrifugasi. Selanjutnya lapisan atas media dipindahkan ke tube 15 ml untuk disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm, suhu 28 °C selama 5 menit. Sedangkan untuk kelompok spermatozoa tanpa swim up, sampel spermatozoa langsung disentrifugasi dalam media fertilisasi. Setelah sentrifugasi baik pada kelompok swim up atau tanpa swim up, supernatan dibuang dan pellet ditambahkan media fertilisasi sampai konsentrasi akhir spermatozoa adalah 1×10^6 spermatozoa/ml, kemudian dibuat drop dan ditutup dengan mineral oil. Oosit yang telah dimaturation dimasukkan ke dalam drop spermatozoa dan diinkubasi selama 12-14 jam dalam inkubator CO₂ 5% temperatur 39 °C.

Evaluasi Tingkat Fertilisasi *in Vitro*

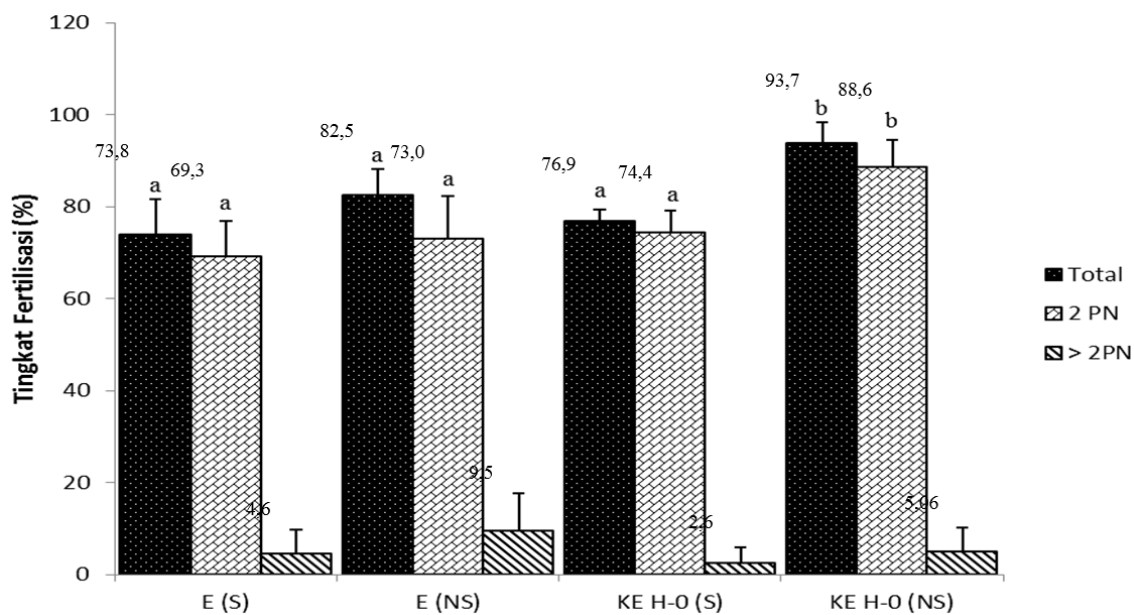
Evaluasi keberhasilan fertilisasi dilihat 12-14 jam setelah inkubasi. Sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan cara dipipet berulang-ulang. Oosit difiksasi dengan aceto-ethanol selama 48-72 jam. Oosit yang telah terfiksasi diwarnai dengan aceto-orcein 2% untuk mengevaluasi pembentukan pronukleus (PN) menggunakan mikroskop fase kontras (Olympus IX 70, Japan). Oosit yang telah mengalami fertilisasi ditandai dengan terbentuknya dua pronukleus (jantan dan betina, 2PN) atau lebih (>2PN) dalam sitoplasma oosit.

Analisis Data

Data tingkat fertilisasi oosit *in vitro* disajikan dalam bentuk persentase dan dianalisa menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) taraf nyata 95% dengan lima kali ulangan. Apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Fisher's *Protected Least Significant Difference* (PLSD). Data diolah menggunakan program Statview (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA).

HASIL

Evaluasi perkembangan inti oosit setelah fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan mengamati pembentukan pronukleus (PN). Oosit yang terfertilisasi ditandai dengan terbentuknya dua pronukleus (2PN) atau lebih dari dua pronukleus (>2PN). Tingkat fertilisasi oosit domba setelah difertilisasi



Gambar 1 Tingkat fertilisasi oosit *in vitro* spermatozoa asal kauda epididimis dan ejakulat, dengan (S) atau tanpa (NS) metode swim up. E: spermatozoa ejakulat, KE H-o: Spermatozoa kauda epididimis hari ke-o. Huruf yang berbeda (a,b) menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada bar yang sama.

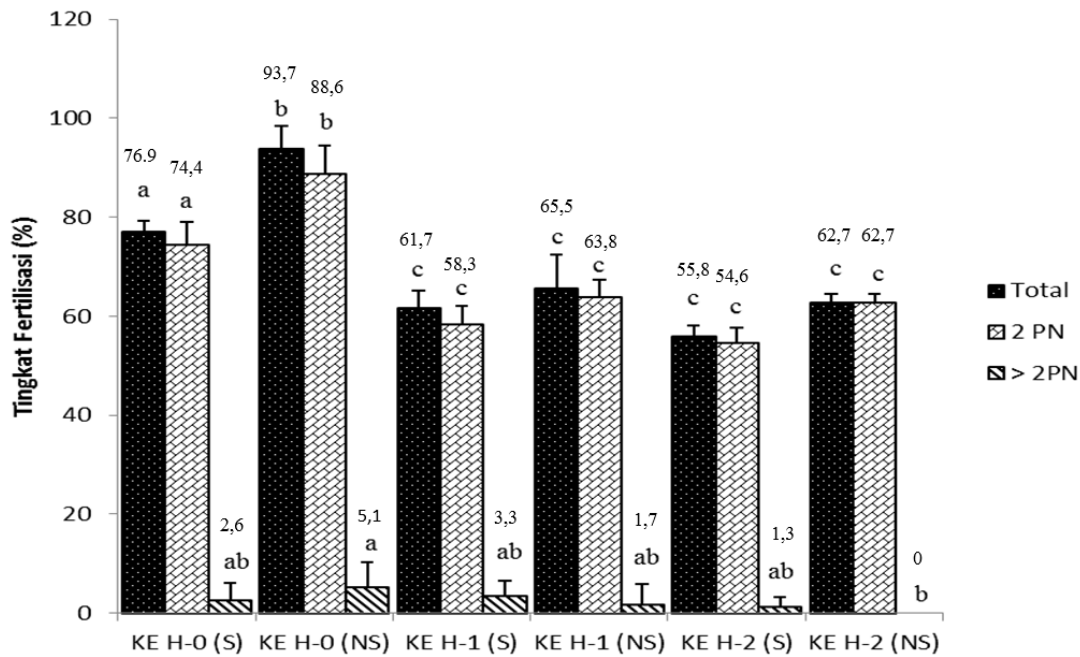
dengan semen dari ejakulat dan kauda epididimis segera setelah hewan mati tanpa disimpan (H-o) dengan dan tanpa metode swim up disajikan pada Gambar 1. Hasil penelitian pada Gambar 1 menunjukkan spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis segera setelah kematian hewan (H-o) memiliki kemampuan yang sama untuk memfertilisasi oosit secara *in vitro* dengan spermatozoa ejakulat ($P > 0,05$).

Pada Gambar 2 menunjukkan tingkat fertilisasi spermatozoa kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4 °C sampai hari kedua (H-2). Dari data tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa kauda epididimis pasca disimpan selama dua hari masih mampu membuahi oosit dengan terbentuknya pronukleus jantan dan betina meskipun tingkat fertilisasinya mengalami penurunan dari H-o (93,67%) sampai H-2 (62,67%). Penurunan persentase tingkat fertilisasi terjadi seiring dengan bertambah lamanya waktu penyimpanan kauda epididimis meskipun secara statistik tidak terdapat perbedaan jumlah oosit yang terfertilisasi normal dan total oosit yang terfertilisasi antara penyimpanan kauda epididimis H-1 dengan H-2 ($P > 0,05$). Hasil ini mendukung hasil penelitian yang dilaporkan oleh Karja et al. (2013) bahwa semakin lama periode penyimpanan kauda epididimis, kemampuan fertilisasi *in vitro* spermatozoa mengalami penurunan secara bertahap.

PEMBAHASAN

Spermatozoa yang mencapai kauda epididimis umumnya motil dan telah matang sehingga memiliki kemampuan untuk memfertilisasi (Toshimori, 2003). Garcia-Macias et al. (2006) menemukan pada domba bahwa spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis, kromatinnya telah mampu terkondensasi dengan baik sama seperti spermatozoa ejakulat. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Blash et al. (2000) pada kambing dan Kaabi et al. (2003) pada domba, bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan baik antara spermatozoa beku asal kauda epididimis maupun spermatozoa ejakulat yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro*.

Tingkat fertilisasi yang cenderung lebih tinggi pada spermatozoa asal kauda epididimis (H-o) (93,67% vs 82,54%) kemungkinan terjadi karena kualitas spermatozoa kauda epididimis yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan spermatozoa ejakulat. Sumber sampel semen ejakulat dan kauda epididimis yang diperoleh dari hewan yang berbeda juga dapat menyebabkan munculnya perbedaan kualitas spermatozoa. Seperti yang dilaporkan Garcia-Alvarez et al. (2009) pada domba, dimana persentase viabilitas spermatozoa dari kauda epididimis lebih tinggi dari ejakulat. Hal tersebut dikarenakan spermatozoa ejakulat memiliki ketahanan yang lebih rendah daripada spermatozoa kauda epididimis terhadap kondisi stres akibat pembekuan, tekanan osmotik, serta penambahan dan penghilangan agen krioprotektan.



Gambar 2 Tingkat fertilisasi oosit *in vitro* dengan spermatozoa kauda epididimis pasca penyimpanan selama dua hari, dengan (S) atau tanpa (NS) metode swim up. KE H-0: Spermatozoa kauda epididimis hari ke-0 pasca penyimpanan, KE H-1: Spermatozoa kauda epididimis hari ke-1 pasca penyimpanan, KE H-2: Spermatozoa kauda epididimis hari ke-2 pasca penyimpanan. Huruf yang berbeda (a,b,c) menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada bar yang sama.

Metode swim up merupakan salah satu teknik pemisahan spermatozoa berdasarkan pada pergerakan spermatozoa motil menuju permukaan media setelah diinkubasi. Teknik pemisahan plasma semen atau krioprotektan dan pemisahan spermatozoa motil dari yang tidak motil dapat dilakukan untuk meningkatkan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Henkel & Schill, 2003). Kemampuan spermatozoa untuk mencapai permukaan media digunakan untuk menyeleksi spermatozoa yang motil. Pada penelitian ini penggunaan metode swim up dan tanpa swim up secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$), dimana metode swim up memberikan pengaruh yang sama terhadap peningkatan kemampuan fertilisasi dengan metode tanpa swim up baik spermatozoa ejakulat maupun spermatozoa asal kauda epididimis. Banyaknya energi yang telah dihabiskan spermatozoa selama proses swim up dan sentrifuge diduga mempengaruhi penurunan motilitas spermatozoa sehingga mengakibatkan tidak berpengaruhnya metode swim up dalam peningkatan persentase tingkat fertilisasi *in vitro* domba.

Persentase polispermia antara spermatozoa ejakulat dan spermatozoa asal kauda epididimis secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Polispermia merupakan ke-

jadian patologis yang menyebabkan kegagalan pada perkembangan pada beberapa jenis mamalia (Park *et al.*, 2009). Salah satu penyebab terjadinya polispermia dalam fertilisasi *in vitro* adalah tingginya angka konsentrasi spermatozoa yang digunakan (Han *et al.*, 1999).

Penurunan persentase tingkat fertilisasi yang terlihat pada Gambar 2 terjadi seiring dengan bertambah lamanya waktu penyimpanan kauda epididimis meskipun secara statistik tidak terdapat perbedaan jumlah oosit yang terfertilisasi normal dan total oosit yang terfertilisasi antara penyimpanan kauda epididimis H-1 dengan H-2 ($P > 0,05$). Hasil ini mendukung hasil penelitian yang dilaporkan oleh Karja *et al.* (2013) bahwa semakin lama periode penyimpanan kauda epididimis, kemampuan fertilisasi *in vitro* spermatozoa mengalami penurunan secara bertahap.

Semakin lamanya waktu penyimpanan kauda epididimis, spermatozoa mengalami penurunan daya preservasi yang menyebabkan menurunnya viabilitas. Hal tersebut mengakibatkan banyaknya spermatozoa yang mati selama penyimpanan dan akan menjadi toksik bagi spermatozoa yang masih hidup. Seperti yang dilaporkan Hishinuma *et al.* (2003) pada rusa sika, persentase viabilitas spermatozoa asal kauda epididimis mengalami penurunan

selama penyimpanan sampai hari keempat. Garde et al. (1998) melaporkan pada rusa merah viabilitas dan kemampuan fertilisasi spermatozoa menurun akibat semakin lamanya waktu antara kematian hewan dengan waktu pengkoleksian semen. Martins et al. (2009) melaporkan bahwa kauda epididimis sapi yang disimpan pada lemari es mampu memperpanjang daya hidup spermatozoa, akan tetapi terjadi penurunan motilitas setelah penyimpanan selama 72 jam.

Terjadinya penurunan motilitas selama penyimpanan juga mempengaruhi kemampuan spermatozoa dalam memfertilisasi oosit. Penurunan persentase motilitas pada spermatozoa kucing asal kauda epididimis yang disimpan pada suhu 5 °C mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu simpan (Ganan et al., 2009). Sebagai upaya untuk meningkatkan persentase spermatozoa yang motil pada fertilisasi *in vitro*, dilakukan teknik pemisahan spermatozoa menggunakan metode swim up. Peningkatan persentase spermatozoa motil diharapkan mampu meningkatkan kemampuan fertilisasi spermatozoa asal kauda epididimis pasca penyimpanan pada suhu 4 °C. Akan tetapi metode tersebut tidak memberi pengaruh yang nyata terhadap tingkat fertilisasi spermatozoa kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4 °C sampai hari kedua karena tingkat fertilisasi spermatozoa kauda epididimis yang di swim up tidak berbeda dengan yang tanpa swim up ($P > 0,05$) pada setiap kelompok perlakuan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kualitas spermatozoa yang sudah menurun seiring dengan bertambahnya lama periode penyimpanan. Tanphaichitr et al. (1988) melaporkan bahwa pemisahan spermatozoa dengan swim up akan memberikan tingkat fertilisasi yang tinggi apabila sampel semen mempunyai kualitas yang tinggi.

Persentase polispermia pada spermatozoa kauda epididimis pasca penyimpanan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) seiring dengan bertambahnya lama waktu penyimpanan. Namun, terjadi penurunan tingkat polispermia pada spermatozoa pasca penyimpanan dengan menggunakan metode swim up. Seperti yang dilaporkan Park et al. (2009), metode swim up berpengaruh terhadap penurunan tingkat polispermia pada fertilisasi *in vitro* babi. Hal tersebut dikarenakan metode swim up dapat mengontrol jumlah spermatozoa yang mencapai oosit serta membatasi jumlah binding spermatozoa terhadap zona pelusida, Metode swim up akan mempengaruhi penurunan konsentrasi spermatozoa dikarenakan hanya spermatozoa motil yang akan terseleksi. Polispermia pada fertilisasi dapat terjadi pada beberapa spesies mama-

lia oleh beberapa alasan seperti penuaan oosit, abnormalitas pada zona pelusida, tingginya jumlah spermatozoa yang telah dikapasitasi pada media fertilisasi, dan kondisi media kultur yang tidak tepat baik sebelum maupun selama IVF (Wang et al., 2003).

Berdasarkan data yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa metode persiapan spermatozoa dengan swim up memberikan pengaruh yang sama dengan metode tanpa swim up terhadap tingkat fertilisasi spermatozoa asal kauda epididimis yang disimpan pada suhu 4 °C selama dua hari. Kemampuan fertilisasi spermatozoa asal kauda epididimis domba yang disimpan pada suhu 4 °C mengalami penurunan sampai hari kedua, namun spermatozoa tersebut masih mampu membuahi oosit secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi melalui Hibah Penelitian Perguruan Tinggi Institut Pertanian Bogor tahun 2014 yang telah mendanai sebagian dari penelitian ini.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”

DAFTAR PUSTAKA

- Axner E, SormHolst B, Linde-Forsber C. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electro ejaculation and comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50: 973-979.
- Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 71:143-155.
- Blash S, Melican D, Gavin W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54: 899-905.
- Centola GM, Herko R, Andolina E, Weisensel S. 1998. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertility and Sterility* 70:1173-1175.
- Ehling C, Rath D, Struckmann C, Frenzel A, Schindler L, Niemann H. 2006. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology* 6: 2160-4.

- Ganan N, Gomendio M, Roldan ERS. 2009. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 °C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology* 72: 1268-1277.
- Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Martinez-Pastor A, Garde JJ, Ramon M, Fernandez-Santos MR, Estes MC, Perez-Guzman MD, Soler AJ. 2009. Sperm characteristics and *in vitro* fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Machega ram: electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology* 72:160-168.
- Garcia-Macias V, Martinez-Pastor F, Alvarez M, Garde JJ, Anel E, Anel L, de Paz P. 2006. Assessment of chromatin status (SCSA1) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology* 66: 1921-1930.
- Garde J, Ortiz N, Garcia A, Gallego AL, Landete CT, Lopez. 1998. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Archives of Andrology* 41: 195-202.
- Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, Moon HB, Cabot RA, Day BN, Prather RS. 1999. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biology of Reproduction* 60:1110-1113
- Henkel RR, Schill WB. 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 108.
- Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology* 59: 813-20.
- Jishage K, Ueda O, Suzuki H. 1997. Fertility of mouse spermatozoa from cauda epididymis preserved in paraffin oil at 4 °C. *Journal of Mammalian Ova Research* 14: 45-48 .
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraez P, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60:1249-1259.
- Karja NWK, Fahrudin M, Setiadi MA. 2013. *In vitro* Fertility of Post-thawed Epididymal Ram Spermatozoa after Storage at 5 °C before Cryopreservation. *Media Peternakan* 36: 26-31.
- Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimmada A, Soloy E, Kaneko H. 1998. Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 50: 615-623.
- Martins CF, Rumpf R, Pereira DC, Dode MN. 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction Science* 101: 326-331.
- Martins CF, Driessen K, Melo Costa P, Carvalho-Net JO, de Sousa RV, Rumpf R, Dode MN. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science* 116: 50-57.
- Park CH, Lee SG, Choi DH, Lee CK. 2009. A modified swim-up method reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Animal Reproduction Science* 115: 169-181.
- Soler AJ, Perez-Guzman MD, Garde JJ. 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphology integrity. *Journal Experimental Zoology* 295A: 188-199.
- Songsasen N, Tong J, Leibo SP. 1998. Birth of live mice derived by *in vitro* fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *Journal Experimental Zoology* 280: 189-196.
- Tanphaichitr N, Agulnick A, Seibel M, Taymor M. 1988. Comparison of *in vitro* fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and percoll gradient centrifugation. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* 5: 119-122.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 66: 1629-1632.
- Toshimori K. 2003. Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. *Microscopy Research and Technique* 61: 1-6.
- Vieira LA, Gadea J, García-Vázquez FA, Avilés-López K, Matás C. 2012. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science* 136: 280-288.
- Wang WH, Day BN, Wu GM. 2003. How does polyspermy happen in mammalian oocytes?. *Microscopy Research and Technique* 61: 335-341.
- Wolf CA, Brass KE, Rubin MIB, Pazzobon SE, Mozzaquatro FD, De La Corte FD. 2008. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction* 5: 110-115.