

ANALISIS KUALITAS SPERMA HEWAN UJI: METODE PENGHITUNGAN BILANGAN SPERMA EPIDIDIMIS TIKUS

Muhammad Ja'far Luthfi

Program Studi Biologi, Fakultas Sains & Teknologi
Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta
Email: jafarluthfi@yahoo.com

Abstract

Sperm sample from epididimal source can be determined its sperm number using minimal amount of equipment. These method will aid researcher and practitioner in sperm number analysis in the field of male animal reproduction accurately.

Keywords: sperm quality, sperm number, hemocytometer

A. PENDAHULUAN

Konsep penggunaan hewan untuk mendeteksi perubahan fungsi reproduksi jantan bukanlah hal baru. Kajian seperti ini sudah dimulai sejak awal tahun 1930 (Amann 1986). Penggunaan hewan uji adalah model pengujian yang penting karena mencerminkan keefektifan, efek samping, ataupun toksisitas suatu bahan secara keseluruhan. Eksperimen ini perlu dilakukan sebelum uji klinis karena banyak aspek fisiologi dan biologi reproduksi tidak dapat dikaji secara langsung pada manusia (Farnsworth 1992). Sehingga kini metode tersebut masih merupakan pilihan utama dalam penilaian bioaktivitas maupun toksisitas suatu bahan terhadap sistem reproduksi (Huang et al. 2004).

Berbagai hewan dipakai dalam pengujian sistem reproduksi jantan, masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Namun demikian tikus paling banyak digunakan untuk keperluan ini atas beberapa alasan. Tikus merupakan hewan model yang menyerupai manusia dari segi tertentu. Hewan ini juga mudah dipelihara dan dibiakkan. Tambahan lagi, tikus telah digunakan sebagai hewan uji dalam skrining suatu senyawa untuk mengetahui efek farmakologi meliputi distribusi, mekanisme, dan toksisitasnya (Briggs & Oehme 1980). Penggunaannya secara luas dalam penelitian telah menghasilkan data biologi yang cukup lengkap (Golden 2002; White 2001).

Beberapa metode penilaian sistem reproduksi jantan telah dikembangkan. Salah satu yang umum digunakan ialah analisis kualitas sperma. Analisis kualitas sperma dapat memberikan kita informasi tentang status kesuburan organ genital jantan. Selain diperlukan dalam kajian deskriptif tentang gambaran sperma suatu hewan, penilaian ini juga digunakan dalam kajian toksikologi atau farmakologi suatu bahan terhadap kesuburan jantan. Analisis ini dapat menunjukkan peningkatan atau penurunan kesuburan suatu hewan uji.

Tujuan dari analisis kualiti sperma ialah untuk menilai parameter deskriptif dari sampel sperma hewan uji. Kualitas yang umumnya dinilai ialah bilangan sperma (kepekatan/konsentrasi sperma), morfologi sperma, dan motilitas sperma.

Penentuan bilangan sperma adalah salah satu dari aspek terpenting dalam analisis kualitas sperma. Tujuan dari artikel ini adalah untuk mendeskripsikan teknik praktis penentuan bilangan sperma epididimis tikus untuk kepentingan penilaian status kesuburan hewan uji.

B. METODE

Alat

Peralatan yang diperlukan dalam penentuan bilangan sperma adalah sebagai berikut:

- mikroskop cahaya
- hemositometer *Improved Neubauer*
- pipet
- cawan petri
- gunting bedah kecil
- inkubator
- *hand counter*

Penyediaan Sampel Sperma

Sampel sperma diambil dari kauda epididimis. Kauda epididimis dipisahkan berdasarkan pembagian epididimis yang ditentukan oleh Hamilton (1975), kemudian diletakkan dalam cawan petri, dipotong berulang kali dan diinkubasi dalam 15 mL larutan media Biggers, Whitten, & Whittingham (BWW) (Biggers et al. 1971) selama 30 menit pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO₂ untuk membiarkan sperma berenang dalam media BWW (teknik *swim-up*).

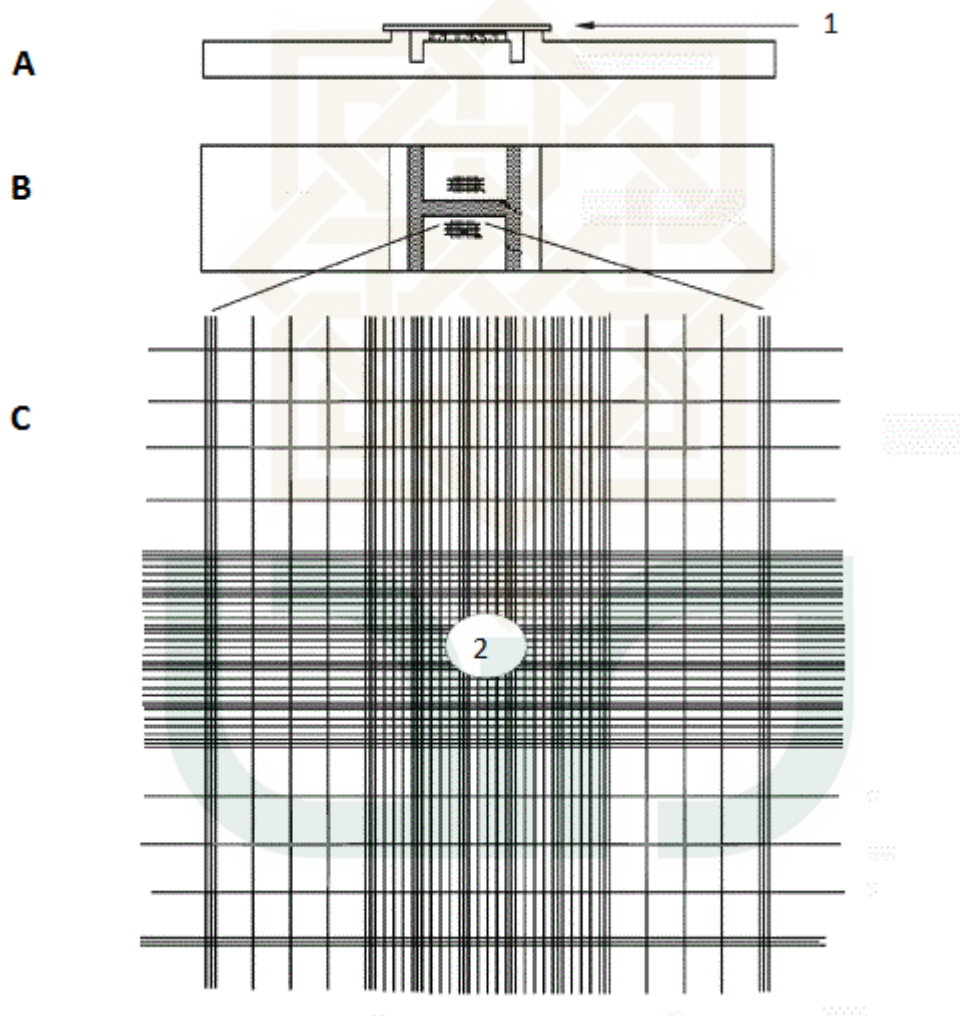
Prosedur Penghitungan Bilangan Sperma

Lekatkan gelas penutup pada bidang penghitungan hemositometer *Improved Neubauer* dengan tepat. Pola interferen (> 10 *newton's rings/fringes* atau *iridescence lines*) seharusnya terlihat antara permukaan kaca kedua area dimana gelas penutup melekat pada hemositometer. Garis/*newton's rings* yang nampak terlalu sedikit menunjukkan bahwa jarak di antara gelas penutup hemositometer melebar, oleh karena itu volume ruang penghitungan menjadi lebih besar dan hasil pengujian menjadi tidak tepat.

Sebanyak 10 µL suspensi sperma dari penyediaan sampel sperma diambil dengan pipet, kemudian disisipkan ke dalam ruang di antara gelas penutup dan slide hemositometer pada satu ruang penghitungan hemositometer. Ruang penghitungan lainnya juga diisi dengan cara yang sama. Masing-masing ruang penghitungan harus diisi secara sempurna. Suspensi disisipkan secara perlahan-lahan untuk membiarkan cairan merata oleh gaya kapiler. Jika pengisian ruang penghitungan tidak sempurna (tidak merata), harus diulang lagi pengisian sampelnya. Pembuangan volume yang berlebihan dari ruang penghitungan tidak boleh dilakukan karena akan mengubah kepekatan sperma pada ruang penghitungan.

Setelah kedua ruang penghitungan terisi sampel, hemositometer dibiarkan 10-15 menit agar sperma terserak dan menetap pada bidang penghitungan. Penghitungan bilangan sperma dilakukan dengan perbesaran 200x menggunakan mikroskop cahaya. Pada bagian

pusat ruang penghitungan hemasitometer terdapat 25 petak besar. Satu “petak besar” pada ruang penghitungan hemasitometer dibatasi semua sisinya oleh garis triple (gambar 1). Penghitungan dilakukan pada kesemua 25 petak pada tiap ruang penghitungan. Untuk sperma yang jatuh pada garis petak, hanya sperma yang kepalanya terletak pada garis atas atau garis kiri petak yang dihitung sebagai milik dari petak tersebut. Oleh karena itu jangan menghitung sperma yang terletak pada garis bawah atau garis kanan petak.



Gambar 1. Hemasitometer. A. tampak samping (angka 1 menunjukkan gelas penutup). B. Tampak atas. C. Salah satu dari dua ruang penghitungan hemositometer (angka 2 menunjukkan salah satu dari 25 petak besar).

Kira-kira 200 sperma pada tiap ruang penghitungan diperlukan untuk memperkecil standard deviasi. Jika bilangan sperma yang diperoleh dari penghitungan pada satu ruang penghitungan kurang dari 150, harus dibuat sampel suspensi sperma yang baru dengan mengurangi volume medium BWW.

Penghitungan Bilangan Sperma per Kauda Epididimis

Pertama, bilangan sperma dari dua ruang penghitungan dijumlahkan kemudian dirata-rata. Kedua, dihitung konsentrasi sperma pada ruang penghitungan. Volume satu petak besar pada hemasitometer adalah 4 nL ($200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$). Jadi volume dari 25 petak besar adalah $25 \times 4\ \text{nL} = 100\ \text{nL}$. Oleh karena itu rata-rata bilangan sperma dari dua ruang penghitungan tadi dibagi dengan volume tersebut ($\times 1/100$). Konsentrasi sperma yang diperoleh adalah jumlah sperma per nL, yang sama dengan juta sperma /mL ($\text{sperma}/10^{-9}\ \text{L} = \text{sperma} \times 10^6/10^{-3}\ \text{L}$). Akhirnya, untuk memperoleh bilangan sperma per kauda epididimis, konsentrasi sperma yang diperoleh dikali dengan jumlah volume media BWW yang digunakan untuk *swim-up* pada penyediaan sampel sperma.

Contoh penghitungan

Sampel sperma epididimis ditambahkan 10 μL larutan BWW dan dilakukan metode *swim-up*. Penghitungan pada ruang penghitungan hemositometer yang satu menghasilkan 320, sedangkan pada ruang penghitungan yang lainnya didapatkan 280. Kedua hasil ini dijumlahkan dan dibagi dua untuk mendapatkan rata-ratanya, didapatkan angka 300. Untuk memperoleh kepekatan sperma per nL, rata-rata penghitungan sperma dari 2 ruang penghitungan tadi dibagi 100, sehingga diperoleh bilangan sperma 3×10^6 per mL suspensi sperma. Untuk memperoleh bilangan sperma per kauda epididimis, konsentrasi sperma tadi (3×10^6 sperma per mL) dikalikan dengan volume BWW yang digunakan untuk *swim-up* pada penyediaan sampel sperma (10 mL) menghasilkan: 30×10^6 sperma per kauda epididimis tikus.

C. PEMBAHASAN

Penentuan bilangan sperma adalah salah satu langkah penting dalam analisis kualitas sperma. Namun demikian, terdapat berbagai variasi metode penghitungan bilangan sperma dari aspek peralatan, teknis, maupun kepraktisannya. Berbagai laboratorium yang berbeda menggunakan metode yang berbeda-beda. Kajian ini menerapkan penggunaan hemasitometer untuk menghitung bilangan sperma. Penetapan metode kebanyakan didasarkan pada praktek dan pengalaman pengujian 300 sampel sperma yang dilakukan pada zologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta dan Laboratorium Zoologi Fakultas Sains dan Teknologi Universiti Kebangsaan Malaysia (data tidak ditampilkan).

Jumlah sperma atau konsentrasi sperma dari spesies uji dapat ditentukan dari sampel ejakulat, epididimis, atau testis. Penentuan jumlah sperma epididimis biasanya hanya menggunakan sperma dari bagian kauda (Clegg *et al.*, 2001). Perubahan jumlah sperma setelah perlakuan bahan atau obat dapat memberi petunjuk penting mengenai pengaruh suatu bahan terhadap produksi sperma (Working, 1988).

Penghitungan jumlah sperma epididimis pada umumnya digunakan pada kajian toksikologi untuk menilai kerusakan pada sistem reproduksi jantan, atau sebaliknya, untuk menentukan pengaruh terapeutik suatu bahan. Pengurangan jumlah sperma epididimis menandakan pengurangan pada produksi sperma harian oleh testis, rintangan pengangkutan dari testis ke epididimis, atau perubahan waktu transit epididimis daripada sperma.

Pada umumnya penentuan jumlah sperma epididimal dilakukan menggunakan hemasitometer (Strader *et al.*, 1996). Penentuan konsentrasi sperma dengan hemasitometer adalah dasar utama untuk menentukan apakah suatu sampel normal, dan untuk memprediksi apakah suatu individu subur. Penghitungan dengan hemasitometer sudah menjadi metode standar untuk pengukuran konsentrasi sperma (Freud & Carol, 1964). Dibandingkan dengan

metode lain, hemositometer masih merupakan metode yang lebih baik untuk penentuan jumlah sperma (Kuster, 2005).

Pada kajian ini, jumlah volume BWW yang digunakan dalam pengenceran sampel sperma adalah 10 μ L. Namun demikian jumlah ini dapat ditambah atau dikurangi untuk mendapatkan kepadatan sperma yang sesuai. Pada beberapa kasus, diperlukan sehingga 20 μ L larutan BWW untuk pengenceran agar didapatkan kepadatan sperma yang ideal untuk dihitung (200-400 sperma dalam ruang penghitungan hemositometer).

Beberapa hal perlu diperhatikan untuk mencapai akurasi dalam penggunaan metode ini. Yang pertama, kita harus memastikan bahwa bagian kauda yang dipotong adalah konsisten pada setiap ulangan. Kedua, penyisipan sampel dengan mikropipet pada masing-masing ruang penghitungan harus sempurna. Ketiga, suhu ruangan yang digunakan pada penentuan bilangan sperma ini harus sama untuk seluruh penghitungan sampel sperma. Hal-hal tersebut mempengaruhi konsistensi penghitungan bilangan sperma. Prosedur yang diikuti dengan ketat akan menjamin akurasi penghitungan bilangan sperma.

D. KESIMPULAN

Menggunakan metode ini, peneliti dapat melakukan penentuan bilangan sperma tikus secara praktis. Kebanyakan bahan dan alat yang digunakan dalam metode ini dapat diperoleh secara mudah. Meningkatnya kepentingan analisis bilangan sperma akan selaras dengan penerapan dan pengembangan metode ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R. P. 1986. Detection of Alterations in Testicular and Epididymal Function in Laboratory Animals. *Environmental Health Perspectives* 70: 149-158.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K. & Whittingham, D. 1971. The culture of mouse embryos in vitro dlm Daniel, J.C. (ed). *Methods in Mammalian Embryology*. hlm 86-116. Freeman, San Francisco, CA.

- Briggs, G.B. & Oehme, F.W. 1980. Toxicology dlm Baker, H.J. et al. (ed). *The Laboratory Rat. Volume II. Research Application*. hlm 104-118. Academic Press. New York.
- Farnsworth, N.R. 1992. Preclinical Assesment of Medicinal Plants dlm Baba, S. et al. (ed). *Natural Resources and Human Health – Plants of Medicinal and Nutritional Value*. hlm 89. Elsevier. Amsterdam.
- Golden, A.L. 2002. Biomarkers of male reproductive health dlm Wilson, S.H. & Suk, W.A. (ed). *Biomarkers of Environmentally Associated Disease. Technologies, Concepts, and Perspectives*. hlm 387-410. Lewis Publisher. New York.
- Hamilton, D.W. 1975. Structure, function of the epithelium lining the ductuli efferents, ductus epididymis and ductus deferens in the rat dlm Hamilton, D.W. & Greep, R.O. (ed). *Handbook of Physiology, Section VII, Endocrinology, vol.5, Male Reproductive System*. hlm 259-301. American Physiological Society, Washington D.C.
- Huang, X., L. Kong, X. Li, X. Chen, M. Guo, H. Zou. 2004. Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography B* 812: 71–84.
- Macpherson, M.L. 2001. How to Evaluate Semen in the Field. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. Volume 47. USA.
- White, W.J. 2001. The use of laboratory animals in toxicologic research dlm Hayes A.W. (ed). *Principles and Methods of Toxicology*. Fourth Edition. hlm 773-775. Taylor & Francis. Philadelphia.