

Tingkat Kerusakan DNA Spermatozoa Memengaruhi Profil Protein Spermatozoa pada Semen Beku Sapi Brahman

(LEVEL OF SPERMATOZOEA DNA DAMAGES
AFFECTS SPERMATOZOEA PROTEIN PROFILES
IN BRAHMAN BULLS FROZEN SEMEN)

Langgeng Priyanto¹, Agung Budiyo²,
Asmarani Kusumawati², dan Kurniasih²

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya,
Jalan Srijaya Negara Bukit Besar, Bukit Lama, Ilir Bar. I,
Kota Palembang, Sumatera Selatan, Indonesia 30128

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
E-mail: langgeng.priyanto@mail.ugm.ac.id

ABSTRAKS

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan kerusakan DNA spermatozoa dengan profil protein spermatozoa setelah pembekuan. Tingkat kerusakan DNA spermatozoa diukur dengan *Sperm-Bos-Halomax* dari dua sampel *straw* sapi brahman dan profil protein spermatozoa diisolasi dengan pemisahan fraksi atas dan bawah hasil sentrifugasi. Profil protein kemudian dianalisis menggunakan **Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE)** dengan konsentrasi separating gel 12,5%. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kerusakan DNA spermatozoa dengan profil protein spermatozoa dengan pemisahan fraksi atas dan bawah. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada fraksi atas tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% ditemukan satu pita protein spermatozoa dengan berat molekul 29 kDa dan pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% ditemukan sembilan pita protein spermatozoa dengan berat molekul 128, 110, 91, 55, 44, 29, 27, 25 dan 20 kDa. Sementara itu pada fraksi bawah semen beku pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% ditemukan empat pita protein spermatozoa dengan berat molekul 105, 82, 56 dan 25 kDa, dan pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% pada fraksi bawah ditemukan delapan pita protein spermatozoa dengan berat molekul 109, 95, 79, 69, 50, 44, 24 dan 18 kDa. Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan profil protein spermatozoa antara tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% dan 10,66%.

Kata-kata kunci: kerusakan DNA spermatozoa; profil protein spermatozoa; SDS PAGE

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the relationship between spermatozoa DNA damages with spermatozoa protein profiles of after freezing. The rate of spermatozoa DNA damages was measured by *Sperm-Bos-Halomax* from two Brahman bull straw samples and the spermatozoa protein was isolated by separating the upper and lower fractions of the centrifugation results. The protein profiles were then analyzed using SDS PAGE with a 12.5% separating gel concentration. The data obtained were analyzed descriptively by comparing level of spermatozoa DNA damages with spermatozoa protein profiles of upper and lower fractions. The results of the analysis showed that in the upper fractions at 37.11% level of spermatozoa damages, one protein band (29 kDa) and at 10.66% level of DNA spermatozoa damages 9 protein bands (128 kDa, 110, 91, 55, 44, 29, 27, 25 and 20 kDa) were found, respectively. Meanwhile, in the lower fractions of frozen semen, at 37.11% level of spermatozoa DNA damages 4 protein bands (105, 82, 56 and 25 kDa), and at 10.66% level of spermatozoa DNA damages 8 protein bands (109, 95, 79, 69, 50, 44,

24 and 18 kDa) were found, respectively. It can be concluded that there are differences in the spermatozoa protein profiles between different levels of spermatozoa damages.

Keywords: DNA damages of spermatozoa; protein spermatozoa profile; SDS PAGE

PENDAHULUAN

Selama proses fertilisasi spermatozoa memberikan kontribusi yang sangat penting untuk proses pembelahan dan perkembangan embrio dengan menyediakan faktor pengaktivasi oosit, komponen centrosomal, dan kromosom paternal (Dogan *et al.*, 2015). Tingkat kerusakan DNA spermatozoa sangat berpengaruh terhadap perkembangan embrio (Vassilev *et al.*, 2005) dan kerusakan DNA spermatozoa berkorelasi negatif dengan kandungan protein DNA spermatozoa (Dogan *et al.*, 2015).

Teknologi reproduksi yang telah digunakan untuk meningkatkan populasi sapi dalam negeri adalah inseminasi buatan (IB). Pelaksanaan IB di lapangan banyak menggunakan semen beku hasil pembekuan dengan pertimbangan masa simpan lebih lama dan pelaksanaannya lebih mudah dibandingkan dengan semen segar. Namun, pada beberapa kasus, pembekuan dan *thawing* dapat menginduksi kerusakan spermatozoa yang berakibat pada penurunan kualitas (Zilli *et al.*, 2005), seperti penurunan motilitas sebesar 28,3% (Priyanto *et al.*, 2015) sampai 40% (Tanaka *et al.*, 2000), penurunan viabilitas sebesar 20-30% (Dhanju *et al.*, 2001), penurunan integritas membran plasma (Nishizono *et al.*, 2000), peningkatan kerusakan DNA spermatozoa 1,84% (Priyanto *et al.*, 2015), peningkatan kesalahan kondensasi kromatin, dan peningkatan fragmentasi DNA (Yildiz *et al.*, 2007). Adanya penurunan kualitas spermatozoa mengakibatkan penurunan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Zilli *et al.*, 2005) dan perkembangan embrio (Vassilev *et al.*, 2005)

Penurunan kualitas spermatozoa selama pembekuan dan *thawing* salah satunya disebabkan oleh peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS). Hasil produk ROS seperti peroksida lipid akan merusak struktur dan fungsi membran dengan mengacaukan struktur fosfolipid dan fluiditas membran (Aitken 1995). Peningkatan Ca^{2+} ekstra dan intraseluler dan adanya peroksida lipid pada membran

fosfolipid akhirnya mengubah struktur dan terdegradasinya membran (Awda 2009). Terdegradasinya membran menyebabkan kerusakan komponen sel yang penting seperti DNA dan protein.

Kerusakan DNA oleh peroksida lipid seperti pembukaan cincin, fragmentasi dan *cross linking protein*-DNA dan pemecahan untai DNA menyebabkan sel mengalami mutasi atau letal (Awda 2009). Selain itu, hasil peroksidasi lipid seperti malondialdehyde (MDA) dan 4-hydroxynonenol juga memicu terjadinya modifikasi oksidasi protein yang dapat merusak enzim *active sites*, merusak konformasi struktural protein dan menyebabkan protein tidak *fold-ing* atau kesalahan *fold-ing* untuk membentuk struktur aslinya (Kumar *et al.*, 2010). Adanya perubahan atau hilangnya susunan protein selama proses spermatogenesis dan proses pembekuan tentunya akan mengakibatkan perubahan aktivitas fungsional protein (Lessard *et al.*, 2000). Salah satu contoh fungsi penting protein spermatozoa adalah sebagai *ligan* untuk pengenalan dengan zona pelusida-3 (ZP3) yang merupakan glikoprotein pada zona pelusida (Morales., 1996). Contoh lain adalah protein spermatozoa dengan berat molekul kurang lebih 100 kDa yang memiliki kemampuan untuk mengaktivasi oosit dan pembelahan (Matsuura dan Maeda, 2006), begitu juga protein 33,11 kDa merupakan protein osilogen yang juga memicu osilasi Ca^{2+} (Parrington *et al.*, 1996) karena osilasi Ca^{2+} yang panjang dapat membantu perkembangan awal embrio (Zhang *et al.*, 2005). Mempertimbangkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan tingkat kerusakan DNA spermatozoa dan profil protein spermatozoa setelah pembekuan ini penting untuk dikaji.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah empat *straw* semen beku sapi brahman yang dikoleksi dari Balai Inseminasi Buatan Lembang, Bandung dan

Balai Inseminasi Buatan Sembawa, Sumatera Selatan. Semen beku yang digunakan adalah semen beku yang telah disimpan selama satu bulan lebih.

Pengujian Kerusakan DNA Spermatozoa dengan *Sperm-Bos-Halomax*

Hasil pemeriksaan fragmentasi DNA spermatozoa disebut DNA fragmentasi indeks (DFI). DNA fragmentasi indeks diperoleh dari persentase total spermatozoa dengan DNA yang rusak dibandingkan jumlah spermatozoa yang diamati (Evenson 2016). Urutan pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa sapi menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* sebagai berikut, langkah pertama encerkan semen dengan konsentrasi akhir 15-20 juta sel /mL dalam *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Langkah berikutnya, lelehkan *agarose* dalam penangas *air/water bath* (90°C-100°C) selama lima menit kemudian inkubasi *agarose* pada suhu 37°C selama lima menit. Lalu Ambil 25 µL semen dan masukkan dalam *agarose (mixing)*. Suspensi semen kemudian dimasukkan dalam gelas objek sebanyak 25 µL, kemudian tutup dengan gelas penutup. Inkubasi preparat dalam kulkas selama lima menit. Lalu angkat perlahan gelas penutup kemudian teteskan dengan *Lysis Solution (LS)* hingga *agarose* terendam, inkubasi pada suhu ruang selama lima menit. Preparat diinkubasi dalam aquadest selama lima menit.

Preparat diinkubasi dalam etanol 70%, 90%, 100% (masing-masing dalam waktu empat menit). Preparat dieringanginkan preparat, kemudian preparat diinkubasi dalam aquadest selama lima menit, kemudian keringanginkan. Lalu lakukan *staining* preparat: Inkubasi preparat dalam kotak berisi pewarna *Eosin* selama lima menit, kemudian cuci menggunakan aquadest dalam kotak selama dua menit. Inkubasi preparat dalam kotak berisi pewarna *Methylene Blue* selama lima menit kemudian cuci menggunakan aquadest dalam kotak selama dua menit. Lalu amati preparat di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400 kali dengan menggunakan *green filter*. Pemeriksaan dilakukan terhadap 500 spermatozoa untuk setiap sampel (Garcia-Macias *et al.*, 2007).

Isolasi Protein Spermatozoa

Metode isolasi protein spermatozoa yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan metode yang digunakan Cheema *et al.* (2010). Spermatozoa dan seminal plasma dipisahkan menggunakan PBS hangat pH 7,4 dengan sentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Diambil fraksi atas dan bawah, lalu ditambahkan PBS hangat pH 7,4 pada masing-masing fraksi tersebut.

Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Diambil pelet dan ditambahkan PBS hangat pH 7,4, lalu disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Diambil pelet dan ditambahkan buffer ekstrak protein yang mengandung 1M Tris Cl-pH 6,8, 5M NaCl, 10% sodium deoxycholate, 20% SDS dan ddH₂O. Hasil akhir adalah isolat crude protein yang disimpan pada suhu -20°C sampai akan dilakukan elektroforesis.

Analisis Profil Protein

Profil protein spermatozoa dianalisis menggunakan SDS PAGE dengan konsentrasi separating gel 12,5% dan *stacking gel* 5%. *Running* sampel dilakukan pada arus konstan 30 mA selama kurang lebih 60 menit. Gel hasil *running* diwarnai menggunakan Commasie Brilliant Blue sampai pita protein kelihatan jelas.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan tingkat kerusakan DNA spermatozoa dan profil protein hasil SDS PAGE setelah pembekuan baik fraksi atas maupun fraksi bawah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Tingkat Kerusakan DNA Spermatozoa

Sperm-Bos-Halomax adalah kit diagnostik *in vitro* yang digunakan untuk pengukuran kerusakan DNA spermatozoa pada spesies hewan yang berbeda. *Sperm-Bos-Halomax* dapat mengevaluasi kualitas spermatozoa yang lebih baik. Peningkatan kerusakan DNA spermatozoa memiliki dampak negatif pada tingkat fertilisasi dan

perkembangan embrio (Vassilev *et al.*, 2005). Hasil analisis *Sperm-Bos-Halomax* didasarkan pada respons DNA yang rusak dan yang tidak rusak dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* dan mikroskop cahaya.

Sperm-Bos-Halomax pada prinsipnya memeriksa dekondensasi diferensial kromosom DNA spermatozoa. Spermatozoa yang mengalami kerusakan DNA berpedar bentuk halo didaerah kepala spermatozoa, sedangkan yang tidak rusak daerah kepala tidak berpedar. Berdasarkan bentuk halo dapat dibedakan menjadi dua kriteria yaitu yang berbentuk halo (berpedar) yang menunjukkan kerusakan DNA pada spermatozoa dan yang tidak menunjukkan halo (tidak berpedar) untuk DNA spermatozoa yang utuh.

Hasil pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa dengan *Sperm-Bos-Halomax* ditemukan pada sapi 40002 sebesar 37,11% dan pada sapi 40885 sebesar 10,66%. Enciso *et al.* (2011) melaporkan kerusakan DNA spermatozoa pada sapi Friesian-Holstein sebesar 17,89% dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* dan laporan Nava-Trujillo *et al.* (2011) pada sapi Brahman ditemukan kerusakan DNA spermatozoa sebesar 4,17±2,69%. Langdon (2012) menunjukkan kerusakan DNA spermatozoa kuda sebesar 13% dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* dinyatakan normal walaupun ada juga yang tinggi sampai 42% dari individu kuda yang abnormal. Serafini *et al.* (2016) melaporkan kerusakan DNA spermatozoa pada kerbau sebesar 6-15% di Italia dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* menyebabkan kebuntingan 57% pada umur kebuntingan 30 hari dan menyebabkan kebuntingan 55% pada umur 45 hari setelah inseminasi buatan.

Beberapa penelitian lain melaporkan tingkat kerusakan DNA spermatozoa atau *Sperm DNA Fragmentasi Indeks (SDFi)* tertinggi yang ditemukan pada spermato-

zoa sapi sekitar 7% sampai 10% dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan inseminasi buatan yang paling rendah dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* (Halotech DNA, Madrid, Spain) (Karoui *et al.*, 2012). Meseguer *et al.* (2011) menyatakan kerusakan DNA spermatozoa menyebabkan kegagalan kebuntingan sebesar 6,9% dan sisanya disebabkan oleh faktor lain. Dogan *et al.* (2015) menyatakan kerusakan DNA spermatozoa ada hubungannya dengan kandungan protein pada spermatozoa tersebut. Semakin tinggi kerusakan DNA spermatozoa maka semakin rendah kandungan protein spermatozoa tersebut.

Analisis Profil Protein Spermatozoa

Berdasarkan hasil elektroforesis dapat diketahui perbedaan profil protein spermatozoa pada fraksi atas dan bawah dari semen beku (Gambar 1 dan gambar 2). Perbedaan profil protein dapat dilihat berdasarkan keberadaan pita-pita protein dan variasi berat molekul protein. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada fraksi atas tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% ditemukan satu pita protein spermatozoa dengan berat molekul 29 kDa dan pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% ditemukan sembilan pita protein spermatozoa dengan berat molekul 128, 110, 91, 55, 44, 29, 27, 25 dan 20 kDa. Sementara itu pada fraksi bawah semen beku pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% ditemukan empat pita protein spermatozoa dengan berat molekul 105, 82, 56 dan 25 kDa, dan pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% pada fraksi bawah ditemukan delapan pita protein spermatozoa dengan berat molekul 109, 95, 79, 69, 50, 44, 24 dan 18 kDa. Melihat hasil penelitian diatas, sesuai dengan penelitian Dogan *et al.*, (2015) menyatakan kerusakan DNA spermatozoa ada hubungannya dengan kandungan protein pada spermatozoa tersebut. Semakin tinggi kerusakan DNA

Tabel 1. Parameter kualitas spermatozoa sapi brahman antara pejantan 40002 dan 40885

Parameter	Pejantan 40002	Pejantan 40885
Kerusakan DNA	37,11%	10,66%
Pita protein fraksi atas	1	9
Pita protein fraksi bawah	4	8

spermatozoa maka semakin rendah kandungan protein spermatozoa tersebut.

Penelitian Ollero *et al.* (1998) yang menggunakan sampel sapi menunjukkan bahwa ada perbedaan profil protein spermatozoa antara semen segar dan beku hasil pembekuan. Ada empat pita protein dengan berat molekul 245, 100, 68, dan 35 kDa yang tidak terdeteksi pada semen beku. Tidak terdeteksinya pita protein karena telah hilang selama proses pembekuan. Adanya perbedaan berat molekul yang ditemukan pada penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan Ollero *et al.* (1998) dimungkinkan karena individu sapi yang berbeda dan parameter waktu pembekuan yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan penelitian Ollero *et al.* (1998). Hilangnya protein spermatozoa selama pembekuan disebabkan oleh banyak faktor. Salah satunya adalah adanya peningkatan kadar ROS selama pembekuan (Awda 2009).

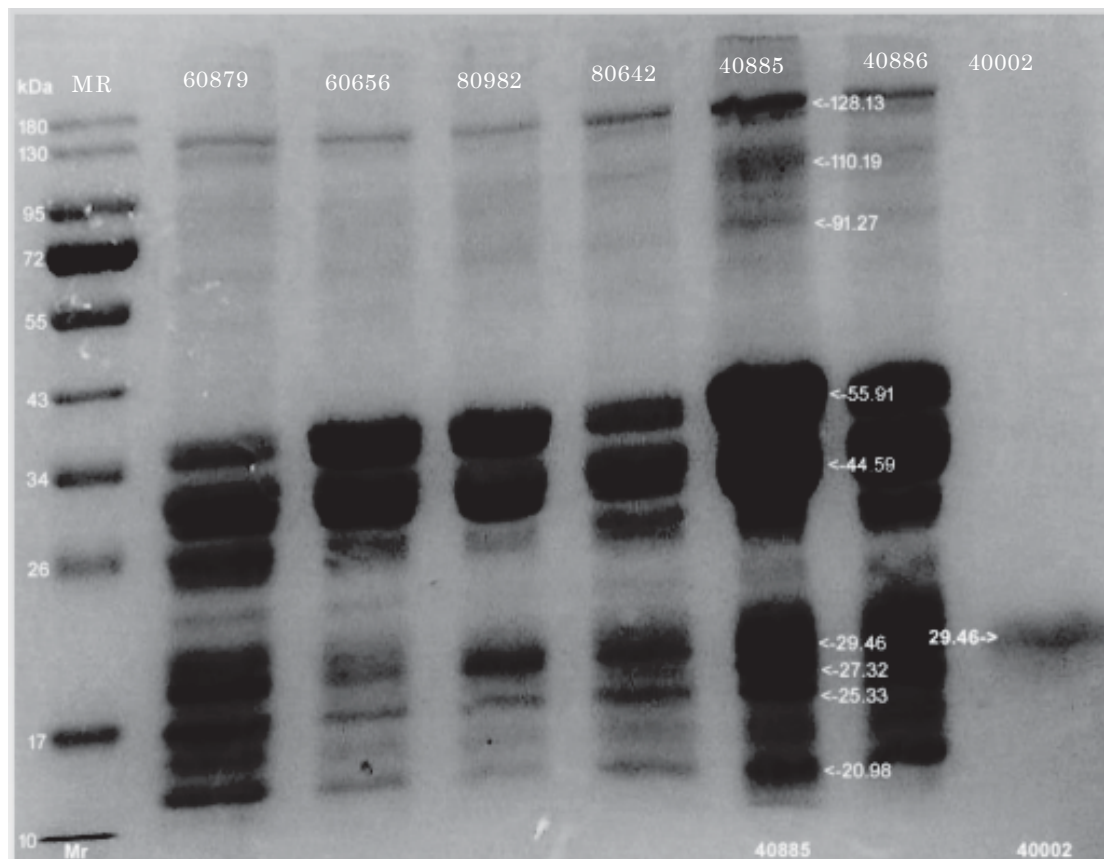
Terjadinya peningkatan Reactive Oxygen Spesies/ROS pada pembekuan disebabkan karena habisnya atau kurangnya antioksidan yang tersedia pada spermatozoa tidak mampu mengubah oksigen reaktif (O) menjadi senyawa yang netral (O₂) karena adanya stres oksidasi pada proses oksidasi fosforilasi. Rendahnya produksi O₂ menginduksi terjadinya peroksida lipid (Lamirande *et al.*, 1997). Peroksida lipid merusak struktur dan fungsi membran dengan mengacaukan struktur fosfolipid dan fluiditas membran (Aitken., 1995). Peningkatan ekstra dan intraseluler Ca²⁺ dan peroksida lipid pada membran fosfolipid akhirnya mengubah struktur dan degradasi membran (Awda 2009). Degradasi membran menyebabkan terdegradasinya komponen sel yang penting seperti protein dan DNA. Protein yang telah terdegradasi oleh produk ROS dengan mudah berpindah ke medium ekstraseluler karena membran sel yang telah rusak (Zilli *et al.*, 2005).

Pembekuan semen yang mengakibatkan terdegradasinya beberapa molekul protein spermatozoa berkorelasi terhadap penurunan kualitas spermatozoa, seperti penurunan motilitas sebesar 40% (Tanaka *et al.*, 2000), peningkatan abnormalitas, penurunan viabilitas sebesar 20-30% (Dhanju *et al.*, 2001) dan penurunan kemampuan kapasitas saat fertilisasi (Nandre., 2013).

Hasil penelitian seperti disajikan pada Gambar 1 dan 2, hasil elektroforesis diketahui terdapat perbedaan tebal dan tipis pita protein antara sapi brahman pejantan 40885 dan pejantan 40002. Secara keseluruhan pita protein 40885 lebih tebal dibandingkan pita protein 40002 baik fraksi atas maupun fraksi bawah. Adanya perbedaan tebal tipisnya pita protein dipengaruhi oleh konsentrasi total protein pada masing-masing sampel. Semakin tinggi konsentrasi total protein maka pita yang tercetak dalam gel akan semakin tebal, begitu juga semakin rendah konsentrasi total protein maka pita yang tercetak dalam gel semakin tipis (Susan dan Rahayu., 2013).

Menurut Subagyo (2015) pita protein dengan ketebalan dan intensitas warna lebih besar dinyatakan sebagai pita mayor. Pita mayor merupakan pita protein yang memiliki konsentrasi lebih tinggi dibandingkan dengan pita lainnya. Dari gambaran tersebut dapat disimpulkan semakin tinggi kerusakan DNA spermatozoa maka semakin kecil konsentrasi proteinnya. Hal ini ditandai dengan tipis pita proteinnya. Besar kecilnya konsentrasi protein dalam spermatozoa memberikan gambaran dari tingkat fertilitas pejantan (Pixton *et al.*, 2004). Hal ini sesuai dengan penelitian Dogan *et al.*, (2015) menyatakan kerusakan DNA spermatozoa ada hubungannya dengan kandungan protein pada spermatozoa tersebut. Semakin tinggi kerusakan DNA spermatozoa maka semakin rendah kandungan protein spermatozoa tersebut.

Pita protein dengan berat molekul 90 kDa diidentifikasi sebagai *heat shock protein 90* (HSP-90) yang memiliki peran penting terhadap toleransi stres serta mengaktifkan *nitric oxide synthase* (NOS) yang bermanfaat untuk membantu motilitas spermatozoa. Semakin tinggi ekspresi HSP-90 maka semakin tinggi pula motilitas dan ketahanan spermatozoa terhadap stres akibat pembekuan dan *thawing* (Cao *et al.*, 2003). Menurut (Alvarez-Gallardo *et al.*, 2013) HSP 90 kDa tidak hanya terdapat pada spermatozoa, tetapi juga terdapat pada embrio tahap awal. Senyawa HSP dapat meningkatkan atau menurunkan ekspresi dari reseptor progesteron, aspek ini dapat memengaruhi kadar progesteron sehingga

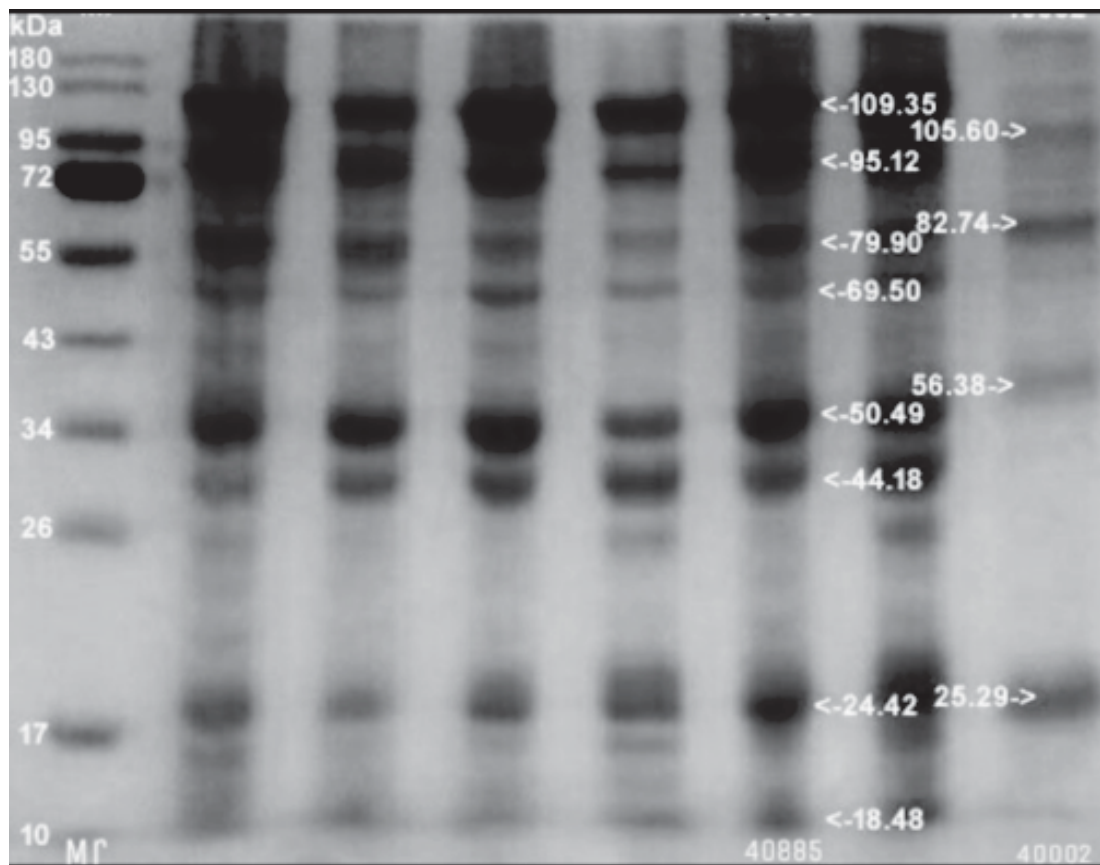


Gambar 1. Hasil profil protein semen beku fraksi atas dengan SDS PAGE

mampu memengaruhi proses kebuntingan. Hasil penelitian ini pada *straw* pejantan 40002 baik fraksi atas maupun fraksi bawah tidak diketemukan profil protein 90 kDa, sedangkan pada *straw* pejantan 40885 ditemukan profil protein 91 kDa pada fraksi bawah dan 95 kDa pada fraksi atas.

Menurut Lenz *et al.* (2000) protein dengan berat molekul 31 kDa diidentifikasi sebagai *heparin binding protein 30* (HBP-30) dengan nama *fertility associated antigen* (FAA). Senyawa HPB-30 ditemukan di kelenjar aksesoris jantan pada vesikula seminalis, prostat dan kelenjar cowper (Alvarez-Gallardo *et al.*, 2013). Fungsi protein tersebut untuk meningkatkan angka kebuntingan sapi sebesar 16-19% (Lessard *et al.*, 2000) dan 24% (Alvarez-Gallardo *et al.*, 2013). Pada penelitian ini ditemukan profil protein 29 kDa pada *straw* pejantan 40002 dan pejantan 40885 pada fraksi atas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi atas pada *straw* 40002 tidak ada fraksi profil protein di atas 100 kDa. Menurut Matsuura dan Maeda. (2006) protein dengan berat molekul berkisar 100 kDa pada spermatozoa babi mengandung materi yang efektif dalam mengaktivasi oosit dan pembelahan perkembangan embrio berikutnya. Hilangnya kandungan protein kisaran 100 kDa dapat menyebabkan terganggunya aktivasi oosit dan perkembangan embrio untuk tahap berikutnya. Kandungan protein sangat penting dalam fertilisasi, aktivasi oosit dan perkembangan embrio berikutnya. Hasil penelitian ini dapat memberikan gambaran bahwa semakin tinggi kerusakan DNA spermatozoa, maka semakin sedikit pita protein yang terbentuk pada elektroforesis menggunakan SDS PAGE. Kandungan protein dapat memberikan gambaran dari kerusakan DNA spermatozoa.



Gambar 2. Hasil profil protein fraksi bawah dari semen beku sapi

SIMPULAN

Hasil dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan profil protein spermatozoa antara tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% dan 10,66% baik profil protein antara fraksi atas dan fraksi bawah yang dapat dilihat dari variasi berat molekul protein. Profil protein dapat memberikan gambaran tingkat kerusakan DNA spermatozoa.

SARAN

Untuk mengetahui standardisasi kandungan profil protein spermatozoa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, sehingga kualitas spermatozoa dari sisi profil protein dapat diketahui.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Direktur Utama Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Kementerian Keuangan dan Direktur Jenderal Daya IPTEK dan DIKTI Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan pendanaan penelitian. Balai Inseminasi Buatan Lembang Bandung, Balai Inseminasi Buatan Sembawa Banyuwangi Sumatera Selatan dan Laboratorium Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian. Kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini kami ucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

Aitken RJ. 1995. Free Radicals, Lipid Peroxidation and Sperm Function. *Reprod Fertil Dev* 7: 659-668.

- Alvarez-Gallardo H, Kjelland ME, Moreno JF, Welsh Jr TH, Randel RD, Lam m oglia MA, Romo S. 2013. Gamete therapeutics: Recombinant protein adsorption by sperm for increasing fertility via artificial insemination. *PloS one* 8(6): e65083.
- Awda, Basim J, Mackenzie-Bel MI, Marry M, Buhr. 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function. *Biol reprod.* 8: 553-561.
- Cao, Wen-Lei, Yi-Xing Wang, Zu-Qiong Xiang, Zheng Li. 2003. Cryopreservation-induced decrease in heatshock protein 90 in human spermatozoa and its mechanism. *Asian J Androl* 5: 43-46
- Cheema RS, Amrit K. Bansal GS, Bilaspuri VK, Gandotra. 2010. Correlation between the proteins and protein profile(s) of different regions of epididymis and their contents in goat buck. *Animal Science Papers and Reports.* 29: 75-84.
- Dhanju CK, Cheema RS, Kaur SP. 2001. Effects of Freezing On Protein and Profiles Of Sperm Membrane Extracts and Seminal Plasma of Buffalo Bulls. *Journal of Department of Animal Breeding. College of Veterinary Sciences, Punjab Agricultural University, Ludhiana, India.*
- Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser LE, Kaya A, Moura A, Memili E. 2015. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biology of reproduction*, 92(4): 92,1-9.
- Enciso M, Cisale H, Johnston SD, Sarasa J, Fernandez JL, Gosalvez J. 2011. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* 76: 23-32.
- Evenson DP. 2016. The sperm chromatin structure assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci* 169: 56-75
- García-Macías V, de Paz P, Martínez-Pastor F, Alvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, Anel E, Anel L. 2007. DNA Fragmentation assessment by flow cytometry and sperm bos halomax (bright field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm Int. *J Androl* 30(2): 88-98.
- Karoui, S, Diaz, C, Gonzalez-Marin, C, Amenabar, ME, Serrano, M, Ugarte, E, Gosalvez, J, Roy, R, Lopez-Fernandez, C, Carabano, MJ. (2012). Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility. *J Anim Sci* 90: 2437-2449.
- Kumar, Vinay, Abul K Abbas, Nelson Fausto, Jon C. Aster, James A, Perkins. 2010. Robbins and Cotran Pathology Basic of Disease, Professional Edition, 8th. Philadelphia. Saunders Elsevier.
- Langdon WC. 2012. *A comparative study on equine sperm chromatin using the sperm chromatin structure assay and the sperm halomax kit® (PhD Thesis)*. Texas (USA). Texas Tech University.
- Lamirande, Eve de Lamirande, Hong Jiang, Armand Zini, Hideya Kodama, Claude Gagnon. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Journal Review Reproduction* 2: 48-54.
- Lenz RW, Zhang HM, Oyarzo JN, Bellin ME, Ax RL. 2000. Bovine fertility associated antigen (FAA) and a recombinant segment of FAA improve sperm function. *Biology of Reproduction* 62: 137-138
- Lessard C, S Parent, P Leclerc, JL Bailey, R Sullivan. 2000. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *Journal Androl* 21: 700-707.
- Matsuura D, Maeda T. (2006). Effects of Sperm Extract and its Molecular Weight Fractions on Oocyte Activation in Miniature Pig Spermatozoa. *Journal of Mammalian Ova Research.* 23(3):122-127.
- Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. 2011. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and sterility* 95(1): 124-128.
- Morales P, Llanos M. 1996. Interaction of human spermatozoa with the zona pellucida of oocyte: development of the acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience* 1: 146-160.

- Nandre RM, Fatima SH, Bhupal G, Derashri HJ, Joshi CG. 2013. Assessment of variations in Indian Bubalus bubalis seminal plasma proteins during winter and summer seasons. *Iranian Journal of Veterinary Research* 14: 1-8
- Nava-Trujillo H, Quintero-Moreno A, Finol-Parra G, Carruyo G, Vilchez-Siu V, Osorio-Melédez C, Rubio-Guilen J, Valeris-Chacín. 2011. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. *Rev Colombiana de Cien Pec* 24(2): 116-122.
- Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. 2004. Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa After Freezing And Thawing Is Related To Cellular Injury. *Biology of Reproduction* 71: 973-978.
- Ollero MO, Bescos JA, Cebrian-Perez, Muino-Blanco T. 1998. Loss of Plasma Membran Protein of Bull Spermatozoa Through The Freezing-Thawing Process. *Theriogenology* 49: 547-555.
- Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* (6563): 364-379.
- Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Bjordahl L, Ashton PR, Brewis IA. 2004. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Human Reproduction* 19(6): 1438-1447.
- Priyanto L, Arifiantini RI, Yusuf TL. 2015. Deteksi Kerusakan DNA Spermatozoa Semen Segar dan Semen Beku Sapi Menggunakan Pewarnaan Toluidine Blue. *Jurnal Veteriner* 16(1): 48-55.
- Serafini, R., Love, C.C., Coletta, A., Mari, G., Mislei, B., Caso, C., Di Palo, R. 2016. Sperm DNA integrity in frozen-thawed semen from Italian Mediterranean Bufallos and its relationship to in vivo fertility. *Animal Reproduction Science* 172: 26-31.
- Subagyo WC, Suwiti NK, Suarsana IN. 2015. Karakteristik Protein Daging Sapi Bali Dan Wagyu Setelah Direbus. *Buletin Veteriner Udayana* 7(1): 17-25.
- Susan MD, Rahayu S. 2013. Profil Protein Spermatozoa Setelah Pembekuan. *Biotropika: Journal of Tropical Biology* 1(4): 166-170.
- Tanaka H, Herliantien, Herwiyanti E, Lubis OP, Buwono, Pujianto J. 2002. The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project. Japan International Cooperation Agency. p. 2
- Vassilev N, Yotov S, Dimitrov F. 2005. Incidence of early embryonic death in dairy cows. *Trakia J of Scie* 3(5): 62-64.
- Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKerlie C. 2007. Effects of Cryo-preservation On Sperm Quality, Nuclear DNA Integrity, In Vitro Fertilization, And In Vitro Embryo Development In The Mouse. *Biology of Reproduction* 133: 585-595.
- Zhang D, Pan L, Yang LH, He XK, Huang XY, Sun FZ. 2005. Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors, and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. *Human Reproduction* 20(11): 3053-3061.
- Zilli L, Sciafone R, Zonno V, Rossanao R, Storelli C, Viella S. 2005. Effect of Cryopreservation on Sea Bass Sperm Protein. *Journal Biolog of Reproduction* 72: 1262-1267.