

Deteksi Kerusakan DNA Spermatozoa Semen Segar dan Semen Beku Sapi Menggunakan Pewarnaan *Toluidine Blue*

(DETECTION OF SPERM DNA DAMAGE IN FRESH AND FROZEN SEMEN USING TOLUIDINE BLUE STAINING)

Langgeng Priyanto^{1*}, Raden Iis Arifiantini², Tuty Laswardi Yusuf²

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya,
Jln. Raya Palembang-Prabumulih km. 32 Ogan Ilir, Sumatra Selatan 30662
E-mail : priyantolanggeng@gmail.com

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Jln. Agatis, Dramaga, Bogor 16680

ABSTRAK

Integritas *deoxyribonucleic acid* (DNA) spermatozoa sangat penting dalam keberhasilan fertilisasi dan perkembangan embrio. *Toluidine Blue* (TB) merupakan pewarna yang sensitif untuk menguji struktur kromatin DNA spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi kerusakan DNA spermatozoa menggunakan TB, sebelum dan setelah pembekuan. Semen diperoleh dari delapan ekor sapi pejantan unggul, masing-masing dua sapi brahman, ongole, simental, dan limosin, milik Balai Inseminasi Buatan, Lembang, Bandung. Semen ditampung dua kali seminggu menggunakan vagina buatan, kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis termasuk motilitas, viabilitas, integritas membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), konsentrasi spermatozoa, abnormalitas, dan keutuhan DNA spermatozoa. Semen yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan motilitas di atas 70%, konsentrasi spermatozoa di atas 1000×10^6 , dan abnormalitas spermatozoa di bawah 20%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas semen sebelum dan setelah pembekuan berbeda nyata ($P < 0,05$) dalam hal persentase motilitas sperma, viabilitas, MPU dan TAU kecuali integritas DNA tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Integritas DNA semen segar dan beku adalah $93,91 \pm 4,77\%$ dan $92,06 \pm 2,41\%$. Penurunan kerusakan DNA rendah (1,84%) dibandingkan dengan motilitas (28,3%), viabilitas (21,6%), MPU (14,1%), dan TAU (11,8%). Simpulannya adalah *toluidine blue* dapat digunakan untuk mendeteksi kerusakan DNA dan dalam proses pembekuan tidak banyak menurunkan kerusakan DNA spermatozoa.

Kata-kata kunci : kerusakan DNA, *toluidine blue*, spermatozoa sapi

ABSTRACT

Sperm DNA integrity is very important in the success of fertilization and embryo development. Toluidine blue (TB) is a sensitive staining to examine the chromatin structure of sperm. The aim of this study was to detect the sperm DNA damage before and after freezing using TB. Semen was obtained from eight superior bulls (two Brahman, two Ongole, two Simental and two Limosin) belong to Lembang Artificial Insemination Centre. Semen was collected twice a week using artificial vagina, then was evaluated macroscopically and microscopically after collected, including sperm motility, viability, plasma membrane integrity (MI) and acrosome intact (AI), sperm concentration, abnormality and sperm DNA integrity. The semen that been used in this study showed the total motility was more than 70%, sperm concentration was more than 1000×10^6 , and the sperm abnormality was below 20%. The result showed that the quality of semen after freezing processed was decreased significantly ($P < 0.05$) on percentage of sperm motility, viability, MI and AI, whereas there was no different on DNA integrity ($P > 0.05$). Sperm DNA integrity of fresh and frozen semen were $93.91 \pm 4.77\%$ and $92.06 \pm 2.41\%$ respectively. The decrease of DNA integrity was low (1.84%) compared to motility (28.3%), viability (21.6%), MI (14.1%), and AI (11.8%). In conclusion, toluidine blue can be used to detect of DNA damage and the freezing process will not decrease the DNA integrity.

Key words : DNA damage, toluidine blue, bull sperm

PENDAHULUAN

Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang merupakan instansi pemerintah yang bertugas memproduksi dan mendistribusikan semen beku di Indonesia. Semen beku yang didistribusikan telah dianalisis kualitasnya sebelum dan sesudah pembekuan. Pengujian standar kualitas semen beku BIB Lembang berdasarkan Badan Standardisasi Nasional (BSN) adalah motilitas dan skoring individu (SNI 4869.1:2008). Secara konvensional pemeriksaan spermatozoa hanya dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis, hal ini belum menjamin kualitas dari spermatozoa tersebut (Nandre *et al.*, 2011).

Pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa sangat penting dalam peneguhan diagnosis fertilitas seekor pejantan (Erenpreisa *et al.*, 2003), karena untuk dapat melakukan fertilisasi, spermatozoa harus motil, *viable* dengan morfologi yang normal serta mempunyai kromatin yang *intact* (Morel dan Rodriguez-Martinez., 2009). Kerusakan DNA spermatozoa dapat terjadi pada saat spermatogenesis, proses pembekuan dan setelah *thawing*. Kerusakan tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor, di antaranya faktor umur, infeksi pada bagian testis, kurangnya unsur protamin, hormonal, terkontaminasi zat kimia beracun, obat-obatan, hipertermia testis, apoptosis, dan tingginya kadar *reactive oxygen species* (ROS).

Pada saat pembekuan semen, perubahan suhu yang ekstrim pada spermatozoa akan menyebabkan kerusakan sel, sehingga dapat menurunkan motilitas, viabilitas, keutuhan membran plasma, dan merusak DNA spermatozoa. Penelitian mengenai motilitas dan viabilitas serta kerusakan morfologi spermatozoa setelah pembekuan telah banyak dilaporkan, sedangkan kerusakan kromatin atau komponen DNA pada ternak belum banyak dilaporkan, walaupun kerusakan DNA yang tinggi akan menyebabkan rendahnya angka kebuntingan (Aitken *et al.*, 2001). Kromatin spermatozoa yang rusak menyebabkan terlambatnya penyatuan inti saat fertilisasi dan menyebabkan kematian embrio (Cordova *et al.*, 2002). Salah satu penyusun kromatin adalah protamin. Protamin merupakan protein utama di dalam inti spermatozoa yang berikatan dengan DNA (Arpanahi *et al.*, 2009). Protamin berperan penting untuk pembentukan kromatin yang diperlukan agar spermatozoa dapat berfungsi dengan normal. Ekspresi abnormal protamin

menyebabkan terjadinya penurunan motilitas, morfologi, penurunan viabilitas dan peningkatan kerusakan kromatin spermatozoa (Mengual *et al.*, 2003). Selama proses spermatogenesis terutama tahap spermiogenesis terjadi *elongasi* dari spermatid, tahap ini sangat penting karena sekitar 85% inti spermatozoa berupa histon akan diganti oleh protamin (Wykes dan Krawetz., 2003).

Kerusakan DNA dapat dievaluasi dengan beberapa teknik di antaranya *sperm chromatin structure assay* (SCSA), *comet assay*, *terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling* (TUNEL), dan *cytochemical assays* (Kim *et al.*, 2013). *Toluidine Blue* (TB) merupakan metode pemeriksaan status DNA spermatozoa secara tidak langsung karena hanya memeriksa perubahan struktur kromatin spermatozoa yang berhubungan erat dengan stabilitas DNA spermatozoa tersebut (Erenpreisa *et al.*, 2003). Pewarnaan TB terbukti sensitif untuk menguji struktur dan kemasakan pembungkus DNA atau kromatin (Erenpreisa *et al.*, 2003; Prinosilova *et al.*, 2012). Pewarnaan TB termasuk *cytochemical assays* dan mulai dipopulerkan pertama kali oleh Erenpreisa *et al.*, (2003). Teknik ini selain sensitif, sederhana dan murah serta tidak membutuhkan alat yang khusus seperti *flow cytometry* (Kim *et al.*, 2013).

Mengingat fungsi DNA spermatozoa sangat penting dalam fertilisasi dan perkembangan embrio maka penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mendeteksi kerusakan DNA pada semen segar dan pada semen yang telah dibekukan dengan pewarnaan TB.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di BIB Lembang dan di Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR), Fakultas Kedokteran Hewan, IPB dari bulan Juli sampai Desember 2013. Sampel berupa semen segar dan semen beku berasal dari delapan ekor sapi, dari bangsa sapi brahman, ongole, limosin, dan simental. Masing-masing bangsa sapi terdiri dari dua ekor dengan tiga kali koleksi dan prosesi (n=24). Sapi-sapi tersebut milik BIB Lembang dan dipelihara dengan standar pemeliharaan yang baik. Proses koleksi, evaluasi sampai produksi semen beku dilakukan di BIB Lembang, sedangkan pengujian *post thawing* dilakukan di URR.

Koleksi, Evaluasi, dan Pengolahan Semen

Semen dikoleksi dua kali seminggu menggunakan vagina buatan. Semen segar selanjutnya dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume, warna, pH, dan konsistensi. Evaluasi mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), dan keutuhan DNA.

Pengujian Kualitas Semen Segar

Motilitas Spermatozoa. Sebanyak 10 µL semen diambil menggunakan mikropipet diteteskan pada gelas objek dan ditambah NaCl fisiologi dengan perbandingan 1:4. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian diambil satu tetes campuran larutan dan dipindahkan ke gelas objek lain kemudian ditutup gelas penutup. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop (Olympus CH 20) dengan perbesaran 100x dan 400x pada 10 lapang pandang. Penilaian diberikan dalam kisaran 0-100% dengan skala 5%.

Viabilitas (Spermatozoa Hidup). Sebanyak 10 µL semen diletakkan pada gelas objek, ditambah pewarna eosin-nigrosin 50 µL, dihomogenkan dan dibuat preparat ulas serta dikeringkan di atas meja penghangat selama 15-20 detik. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya menggunakan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna dan spermatozoa yang mati akan menyerap warna. Spermatozoa yang hidup dan mati dihitung dalam 10 lapang pandang. Persentase spermatozoa hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Spermatozoa hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah total spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

Membran Plasma Utuh (MPU). Keutuhan membran plasma dievaluasi menggunakan larutan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS). Sebanyak 10 µL semen dimasukkan ke dalam *microtube* berisi 1.000 µL larutan HOS (1,351 g fruktosa dan 0,735 g Na-sitrat dalam 100 mL aquadest; osmolaritas 150 mOsm), dihomogenkan. Campuran larutan tersebut disimpan pada penangas air suhu 37°C. Keutuhan membran plasma spermatozoa dilakukan 30 menit setelah inkubasi dengan cara meneteskan satu tetes campuran larutan pada gelas objek, ditutup menggunakan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop

cahaya dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang normal dan yang bereaksi terhadap larutan HOS dihitung pada 10 lapang pandang. Perhitungan persentase spermatozoa yang beraksi terhadap larutan HOS dilakukan dengan cara :

$$\text{MPU(\%)} = \frac{\text{Total spermatozoa yang bereaksi}}{\text{Total spermatozoa yang bereaksi + tidak bereaksi}} \times 100\%$$

Tudung Akrosom Utuh (TAU). Satu tetes semen dimasukkan ke dalam *microtube* berisi larutan *formol-saline* (2,54 g potassium dihydrogen phosphate, 5,41 g sodium chloride, 6,19 g di-sodium hydrogen phosphate dehydrate, 125 mL formaldehyde solution (37%), dan 875 mL aquadest (Arifiantini 2006). Semen segar dimasukkan dalam larutan *formol-saline* dengan perbandingan 1:100. Dibiarkan selama 1 jam dan diambil satu tetes kemudian diletakkan pada gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom yang utuh ditandai dengan 1/2 sampai 2/3 bagian anterior kepala berwarna lebih gelap dari bagian posterior. Pemeriksaan dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda.

Pengujian Keutuhan DNA. Semen segar diambil dan dibuat preparat ulas pada gelas objek, dikeringudarkan dan difiksasi dalam etanol 96% - aseton (1:1) selama 30 menit pada suhu 4°C. Setelah fiksasi, preparat dikeringudarkan lalu dihidrolisis dalam HCl 0,1 N selama lima menit pada suhu 4°C. Preparat dibilas tiga kali menggunakan air suling, lalu diwarnai dengan pewarnaan TB 0,05%, dan dibiarkan selama 10 menit.

Preparat yang telah diwarnai dicuci kembali dengan air suling dan didehidrasi dengan menggunakan *t-butanol* dua kali serta dibersihkan dengan *xylol* sebanyak dua kali. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Kepala spermatozoa memiliki integritas kromatin yang baik akan berwarna biru terang, sedangkan dengan integritas kromatin yang sudah berkurang akan berwarna biru tua. Pemeriksaan dilakukan pada 100 spermatozoa untuk setiap sampel (Erenpreisa *et al.*, 2003).

Pengujian Kualitas Semen Beku

Semen yang memiliki motilitas spermatozoa di atas 70% dengan konsentrasi di atas 1000 juta/ mL diproses menjadi semen beku. Proses

produksi semen beku dilakukan sesuai dengan protokol BIB Lembang menggunakan bahan pengencer skim *milk egg yolk* dengan konsentrasi gliserol 8% dan dikemas dalam *ministraw* 0,25 mL dengan dosis inseminasi 25 juta/*straw*. Semen beku yang telah diproduksi disimpan dalam kontainer nitrogen cair (-196°C) sampai pengujian lebih lanjut.

Pengujian semen beku dilakukan dengan cara melakukan *thawing* semen beku terlebih dahulu. Semen beku di-*thawing* pada air suhu 37°C selama 30 detik. Semen yang telah di-*thawing* dimasukkan ke dalam *microtube* dan dievaluasi terhadap motilitas, viabilitas, MPU, TAU, dan keutuhan DNA. Prosedur pengujian sama dengan yang dilakukan pada semen segar dengan sedikit modifikasi.

Analisis Data

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *one sample t test* dengan bantuan program *software SPSS 16 for windows* dan *Microsoft excel*. Data disajikan dalam rata-rata dan standar deviasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Secara umum semen segar dari berbagai bangsa sapi (Limosin, Ongole, Brahman dan Simental) yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kualitas baik dan memenuhi syarat untuk dibekukan. Secara makroskopis volume semen berkisar antara 5,81±2,36 mL sampai dengan 8,20±0,75 mL, berwarna krem, konsistensi sedang dan pH antara 6,47±0,16 sampai dengan 6,56±2,92 (Tabel 1). Secara mikroskopis gerakan massa cukup baik dengan nilai antara ++ dan +++, motilitas antara 70,00±0,00% sampai dengan 71,67±3,73%, viabilitas antara 78,63±6,21% sampai dengan 83,93±6,81%, morfologi 92,28±2,19%, konsentrasi spermatozoa terendah adalah 1180,00 ± 204,17 juta/mL dan tertinggi 1578,00±80,00 juta/mL.

Hasil pengujian MPU dan TAU adalah 81,17±7,17% dan 83,72±6,10% (Tabel 1) lebih tinggi dari motilitas (70,41±2,04%). Nilai morfologi normal spermatozoa adalah 92,28±2,19% lebih tinggi dari motilitas, MPU,

Tabel 1 Hasil pemeriksaan kualitas semen segar sapi

Parameter	Limosin	Ongole	Brahman	Simental	Rataan
Makroskopis					
Volume (mL)	6,83±0,58	8,20±0,75	6,00±1,67	5,81±2,36	6,71±0,94
Warna	Krem	Krem	Krem	Krem	Krem
pH	6,51±0,03	6,47±0,16	6,53±0,04	6,56±2,92	6,52±0,03
Konsistensi	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang
Mikroskopis					
Gerakan Massa	+++	+++	++	+++	+++
Motilitas (%)	70,00±0,00	70,00±0,00	71,67±3,73	70,00±0,00	70,41±2,04
Viabilitas (%)	83,93±6,81	82,17±2,19	79,92±2,23	78,63±6,12	81,16±5,36
Morfologi (%)	93,34±7,82	95,35±2,05	90,55±4,09	89,9±4,70	92,28±2,19
Konsentrasi (Juta/mL)	1180±204,17	1578±80,00	1340±242,49	1290±496,12	1347±145,38
MPU (%)	85,76±4,57	79,50±4,86	74,25±13,47	74,92±7,25	81,17±7,17
TAU (%)	84,67±3,40	85,42±5,86	81,17±5,96	83,67±7,16	83,72±6,10
DNA Utuh (%)	94,83±2,92	96,16±1,16	93,83±6,21	90,81±6,13	93,91±4,77

Keterangan : +++ = sangat baik, ++ = baik
MPU : Membran Plasma Utuh
TAU : Tudung Akrosome Utuh

dan TAU. Berdasarkan hasil evaluasi semen segar, seluruh semen yang dikoleksi mempunyai kualitas yang baik dan layak untuk diproses menjadi semen beku, sesuai dengan karakteristik semen sapi yang normal menurut Ax *et al.*, (2000) yaitu volume 5-8 mL, motilitas di atas 70%, konsentrasi di atas 1000 juta/mL dan abnormalitas spermatozoa di bawah 20%.

Hasil pengujian keutuhan DNA pada semen segar dari keempat bangsa sapi (bangsa sapi brahman, ongole, limosin, dan simental) adalah 93,91±4,77% nilai tersebut sangat baik, karena berasal dari sapi-sapi pejantan unggul yang telah diseleksi, dipelihara dengan standar yang baik. Hasil pemeriksaan DNA berarti bahwa DNA pada sapi yang mempunyai kualitas genetik tinggi dan dalam kondisi yang baik memiliki persentase nilai yang tinggi.

Kualitas Semen Beku

Selama proses pembekuan, semen mengalami berbagai perubahan suhu dan tekanan osmotik yang akan menurunkan kualitas spermatozoa. Hasil penelitian ini menunjukkan penurunan kualitas sangat signifikan pada berbagai parameter yang diuji. Penurunan kualitas yang paling tinggi terlihat pada motilitas, viabilitas MPU, dan TAU (Tabel 2). Motilitas mengalami penurunan yang paling tinggi yaitu 28,3%, sedangkan viabilitas turun 21,6%. Membran plasma utuh dan TAU masing-masing turun hanya 14,1% dan 11,8%.

Kerusakan tersebut dapat dipahami karena dalam proses pembekuan, spermatozoa mengalami penurunan suhu ekstrim berkali-kali. Penurunan pertama terjadi pada saat *equilibrasi*, dari suhu ruang menjadi suhu 5°C sehingga spermatozoa mengalami *cold shock*. Penurunan suhu selanjutnya adalah pada saat pembekuan dalam uap nitrogen cair yang diduga

suhunya -130°C. *Cold shock* menyebabkan terjadinya kerusakan pada spermatozoa terutama pada membran plasma. Membran plasma merupakan pelindung spermatozoa bagian luar yang langsung dipengaruhi oleh perubahan lingkungan. Jika kerusakan terjadi pada membran spermatozoa di bagian kepala maka akan terdeteksi pada pemeriksaan viabilitas, sehingga akan banyak spermatozoa yang terwarnai oleh pewarna yang diberikan. Jika kerusakan terjadi di bagian ekor, terutama pada bagian *midpiece*, maka mitokondria akan terganggu sehingga *Adenosin Tri Phosphat* (ATP) tidak diproduksi sehingga motilitas akan terhenti. Collenbrander *et al.*, (1992) menyatakan bahwa untuk bisa menghasilkan ATP dibutuhkan enzim ATP transferase, jika membran pada bagian *midpiece* rusak diduga enzim ini akan hilang dan kemampuan bergerak juga hilang.

Selain akibat *cold shock*, kerusakan juga dapat disebabkan oleh pengencer semen yang mengandung krioprotektan yang bersifat hiperosmotik. Bahan pengencer yang mengandung krioprotektan mempunyai tekanan osmotik di atas 1000 mOsm kg⁻¹ sedangkan tekanan osmotik semen segar adalah antara 250-350 mOsm kg⁻¹ (Arifiantini *et al.*, 2012). Akibatnya proses pembekuan tersebut dapat menurunkan motilitas antara 30% sampai dengan 60%, perubahan morfologi spermatozoa, kerusakan mitokondria dan kerusakan akrosom (Kim *et al.*, 2013).

Keutuhan tudung akrosom juga secara nyata menurun, tetapi persentase penurunan hanya 11,81% tidak sebesar motilitas dan viabilitas, hal ini disebabkan akrosom terlindungi oleh lapisan membran akrosom dalam maupun luar. Pada penelitian ini penurunan kerusakan DNA sangat kecil hanya

Tabel 2 Kualitas semen segar dan semen beku sapi (Rataan±SD)

Parameter	Semen Segar (%)	Semen Beku (%)	Penurunan (%)
Motilitas	70,41±2,04 ^a	42,08±4,40 ^b	28,30
Viabilitas	81,16±5,36 ^a	59,49±9,98 ^b	21,67
MPU	81,17±7,17 ^a	67,01±12,16 ^b	14,15
TAU	83,72±6,10 ^a	71,91±8,34 ^b	11,81
DNA Utuh	93,91±4,77 ^a	92,06±2,41 ^a	01,84

Keterangan : Huruf superskrip berbeda yang mengikuti angka pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata P<0,05
 MPU : Membran Plasma Utuh
 TAU : Tudung Akrosome Utuh

1,84% dan tidak ada perbedaan yang nyata ($P>0,05$) antara semen segar dan semen beku. Hal ini diperkirakan karena DNA spermatozoa terletak pada bagian dalam dari spermatozoa, posisinya terlindungi oleh membran plasma, membran luar akrosom, akrosom dan membran dalam akrosom. Kerusakan atau penurunan terjadi apabila telah terjadi kerusakan pada lapisan di atas yang memengaruhi integritas DNA spermatozoa. Menurut Karoui *et al.*, (2012), kerusakan DNA yang melebihi 7% sampai 10% pada sapi FH, mengganggu fertilitas. Kerusakan DNA 10,34% pada semen beku sapi *White Holstein* telah dilaporkan oleh Bochenek dan Smorag (2010). Sementara itu Nandre *et al.*, (2011) melaporkan adanya kerusakan DNA spermatozoa sebesar 3,00% dan 4,61% pada kerbau sebelum dan sesudah pembekuan pada musim dingin. Kerusakan DNA pada musim panas sebesar 7,61% dan 13,61%.

Evaluasi Kerusakan DNA Spermatozoa dengan Pewarnaan TB

Beberapa faktor yang dapat memengaruhi kerusakan dan kualitas DNA, menurut Morel dan Rodriguez-Martinez (2009) adalah pengaruh lingkungan, pakan, kesehatan, dan kondisi sapi. Lingkungan dan pakan sangat berpengaruh terhadap proses spermatogenesis terutama pada fase spermiogenesis. Pada fase tersebut terjadi pemanjangan dari *round spermatid* menjadi *elongated spermatid*. Fase ini sangat penting karena sekitar 85% inti spermatozoa berupa histon akan digantikan oleh protamin (Wykes dan Krawetz., 2003). Penggantian histon oleh protamin berperan penting dalam penyusunan inti kromatin dan pematangan spermatozoa (Arpanahi *et al.*, 2009).

Kerusakan DNA dari empat bangsa sapi yang diuji tidak berbeda ($P>0,05$) selama pembekuan hanya 1,84% (Tabel 3). Nilai ini tidak berbeda jika dibandingkan dengan DNA pada semen segar. Pengujian lebih lanjut menunjukkan bahwa setiap bangsa sapi berbeda penurunan kerusakan DNANYA. Sapi ongole menunjukkan penurunan integritas DNA sebesar $3,85\pm 1,97\%$ dan berbeda ($P<0,05$) dibandingkan DNA semen segarnya. Penurunan DNA spermatozoa sapi Brahman hanya 0,65%, Limosin 2,72%, dan Simental 0,14%, ketiganya tidak berbeda ($P>0,05$) antara semen segar dan semen beku (Tabel 3).

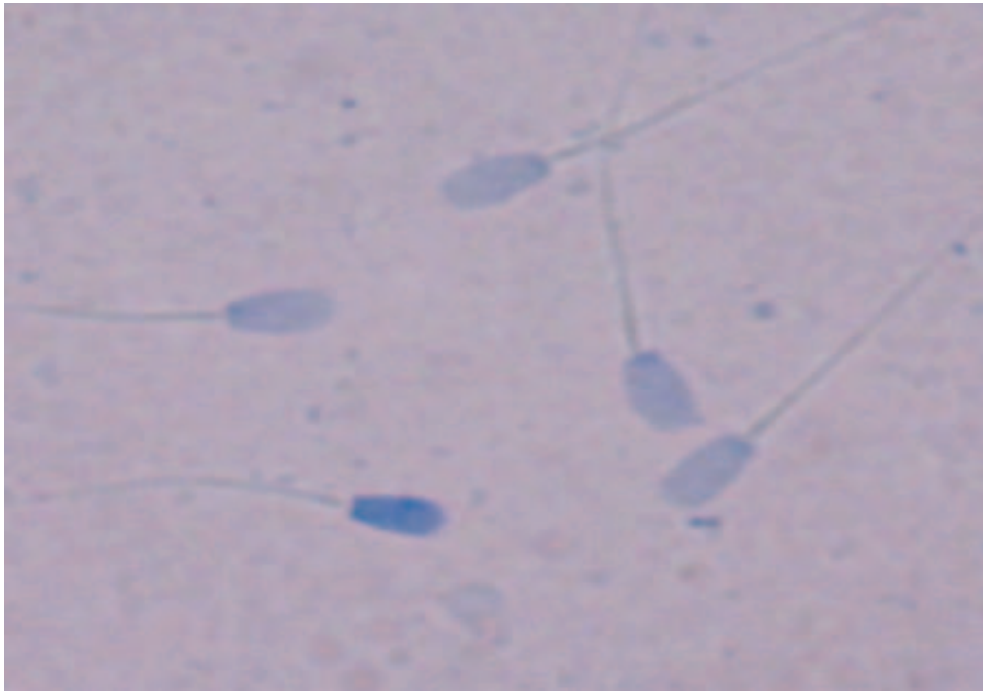
Pewarnaan TB yang digunakan untuk menguji kerusakan DNA pada penelitian ini, sebenarnya telah digunakan selama 40 tahun untuk mendiagnosis suatu penyakit yaitu mendeteksi adanya keganasan pada sel mukosa (Bobot 2011) dan juga dipakai dalam pewarnaan bakteri *Stapylococcus aureus*. Pewarnaan TB mulai dipopulerkan penggunaannya dalam pemeriksaan tingkat kesuburan pejantan dan digunakan sebagai standar pemeriksa kerusakan DNA pada spermatozoa oleh Erenpreisa *et al.*, (2003) dan Beletti *et al.*, (2005). Karena pewarnaan TB ini sensitif, sederhana dan murah serta tidak membutuhkan alat yang khusus maka banyak digunakan oleh para peneliti diantaranya oleh Erenpreisa *et al.*, (2003) pada spermatozoa manusia, Beletti *et al.*, (2005) pada spermatozoa sapi dan Saili (2006) pada spermatozoa domba.

Kualitas kromatin dalam inti sel sangat menentukan status DNA yang terikat erat pada protamin yang berfungsi sebagai pelindung bagi DNA inti (Saili 2006). Perubahan yang terjadi pada kromatin akan berakibat pada perubahan status DNA. Pemeriksaan ini berdasarkan

Tabel 3. Penurunan DNA semen segar dan semen beku sapi dari bangsa yang diuji menggunakan pewarnaan TB (Rataan \pm SD)

Bangsa Sapi	Jumlah (n)	DNA Utuh (%)		Penurunan(%)
		Semen Segar	Semen Beku	
Simental	6	90,81 \pm 6,13 ^a	90,66 \pm 3,76 ^a	0,14
Brahman	6	93,83 \pm 6,21 ^a	93,17 \pm 1,25 ^a	0,65
Ongole	6	96,16 \pm 1,16 ^a	92,31 \pm 1,17 ^b	3,85
Limosin	6	94,83 \pm 2,92 ^a	92,11 \pm 2,39 ^a	2,72
Rataan	24	93,91 \pm 4,77 ^a	92,06 \pm 2,41 ^a	1,84

Keterangan : Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata $P<0,05$



Gambar 1. Pewarnaan TB pada spermatozoa yang mengalami kerusakan DNA, terwarnai biru tua (kepala panah), sedangkan spermatozoa dengan DNA utuh terwarnai biru terang (panah) (Pembesaran 400x)

kondisi dari kondensasi kromatin berupa perbedaan intensitas warna yang dihasilkan. Perubahan ini akan menentukan kualitas proses kondensasi kromatin yang dapat dideteksi melalui pewarnaan TB (Gambar 1). Semakin kompak atau utuh kondensasi yang terjadi, maka warna biru terang akan muncul, sebaliknya pada kondensasi yang kurang kompak atau tidak utuh warna yang muncul biru tua. Kondensasi yang tidak kompak berhubungan positif dengan abnormalitas kromatin dan keutuhan DNA spermatozoa (Saili 2006). Kondisi ini dapat terjadi akibat bermacam-macam faktor seperti terpapar oleh radikal bebas saat proses spermatogenesis (Aitken *et al.*, 1998), akibat apoptosis, kurangnya protein terutama arginin dan sistin, infeksi, stres, paparan zat kimia beracun, hipertermia testis, dan hormonal.

Pada penelitian ini pengujian DNA spermatozoa dari semen segar sapi menemukan bahwa persentase DNA utuh sebesar $93,91 \pm 4,77\%$. Hal ini menyatakan bahwa untuk sapi-sapi yang sudah terseleksi dan dipelihara oleh balai dengan standar pemeliharaan kesehatan dan pakan serta kondisi lingkungan yang baik harus memiliki nilai yang tidak berbeda dengan nilai tersebut. Keutuhan DNA

pada semen beku hasil penelitian ini menunjukkan bahwa balai tersebut telah memiliki teknik pembekuan dan jenis pengencer yang baik sehingga tidak menimbulkan kerusakan DNA yang berlebihan. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa proses pembekuan semen, menurunkan persentase motilitas, viabilitas, MPU, dan TAU tetapi tidak menurunkan keutuhan DNA.

SIMPULAN

Pewarnaan TB dapat digunakan untuk mendeteksi kerusakan DNA spermatozoa pada semen segar dan semen beku. Proses pembekuan semen menurunkan presentasi motilitas, viabilitas, MPU, dan TAU tetapi tidak menurunkan keutuhan DNA. Kerusakan DNA persentasenya rendah selama proses pembekuan.

SARAN

Disarankan agar pengujian DNA dapat dilakukan pada sapi-sapi yang mempunyai fertilitas yang rendah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi melalui Rektor Institut Pertanian Bogor dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat yang telah memberikan dana penelitian dasar, dengan nomer kontrak: 381/IT3.41.2/L2/SPK/2013. Balai Inseminasi Buatan Lembang Bandung dan Unit Rehabilitasi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan bantuan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan, juga kami ucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Aitken R, Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506.
- Arifiantini I, Wresdiyati T, Retnani EF. 2006. Kaji banding morfometri spermatozoa sapi bali (*Bos sondaicus*) menggunakan pewarnaan Williams, eosin, eosin nigrosin dan formol saline. *J Sains Vet.* 24(1):65-70.
- Arifiantini RI. 2012. *Teknik koleksi dan evaluasi semen pada hewan*. Bogor, IPB Press. P 74
- Arpanahi AM, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D. 2009. Endonuclease sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Research* 19:1338-1349.
- Ax RL, Dally MR, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. *Semen Evaluation*. Di dalam: Hafez ESE & B Hafez, editor. *Reproduction in Farm Animal*. 7th ed. USA: Lippincot Williams dan Wilkins.
- Beletti ME, Costa LF, Guardieiro MM. 2005. Morphometric Features and Chromatin Condensation Abnormalities Evaluated by Toluidine Blue Staining In Bull Spermatozoa. *Braz J Morphol Sci* 22(2) : 85-90.
- Bobot I. 2011. *Pewarnaan toluidine blue sebagai tes diagnosa karsinoma sel skuamosa* (Tesis). Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Bochenek M, Smorag Z. 2010. The level of sperm DNA fragmentation in bulls of different breeds. *Ann Anim Sci* 10(4):379-384.
- Colenbrander B, Fazeli AR, Van Buiten A, Parlevliet J, Gadella BM. 1992. Assesment of sperm cell membran integrity in the horse. *Acta Vet Scand Suppl* 88 : 49-58.
- Cordova A, Perez-Gutierrez JF, Lleo B, Garcya-Artiga C, Alvarez A, Drobchak V, Martyn-Rillo S. 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen semen packaged in 0.5 ml and 5 ml straws. *Theriogenology* 57 : 2119-2128.
- Erenpreisa J, Freivalds T, Slaidina M, Erenpreiss J, Krampe R, Butikova J, Ivanov A, Pjanova D. 2003. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry* 52(1) : 19-27.
- 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.
- Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Yup Ku S, Kim SH, Moon SY, Choi YM. 2013. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med* 40(1) : 23-28
- Mengual l, Balleca JL, Ascaso C, Oliva R. 2003. Marked Differences in Protamine Content and P1/P2 Rations in Sperm Cells from Percoll Fractions Between Patients and Control. *J Androl* 24 : 438-447.
- Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open J Androl* 1 : 1-9.
- Nandre R, Derashri H, Joshi C. 2011. Evaluation of buffalo bull spermatozoa DNA damage using single cell gel electrophoresis. A review. *J Life Science and Pharmacol Research* 1: 38-43.
- Prinosilova P, Rybar R, Zajicova A, Hlavicova J. 2012. DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Veterinary Medicina* 57(3) : 133-142.
- Saili T. 2006. *Status DNA Spermatozoa Domba setelah Proses Pengerimbekuan*. (disertasi). Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Wykes SM, Krawetz SA. 2003. The structural organization of sperm chromatin. *The J of Biol Chem* 278(32) : 29471-29477.