

Kerusakan Deoxyribonucleic Acid (DNA) Spermatozoa Memengaruhi Tingkat Kebuntingan Sapi Brahman

*(DAMAGE TO DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) SPERMATOZOA
AFFECTING THE LEVEL OF PREGNANCY IN BRAHMAN CATTLE)*

**Langgeng Priyanto¹, Agung Budiyanto²,
Asmarani Kusumawati² dan Kurniasih²**

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

²Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta DIY.
E-mail: agung_bd2004@yahoo.com

ABSTRAK

Hubungan antara kerusakan DNA spermatozoa pada sapi dengan tingkat kebuntingan belum banyak dilaporkan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan kerusakan DNA spermatozoa dengan tingkat kebuntingan pada sapi Brahman. Tingkat kerusakan DNA spermatozoa diukur dengan *Sperm-Bos-Halomax*[®] dari 2 *straw* sampel semen beku sapi Brahman (dengan kode 40002 dan 40885) dan tingkat kebuntingan diukur dari tingkat keberhasilan inseminasi buatan pada 14 ekor sapi Brahman betina yang dibagi menjadi dua kelompok. Satu kelompok sebanyak tujuh ekor diinseminasi buatan dengan semen pejantan 40002 dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% dan satu kelompok lagi diinseminasi buatan dengan semen pejantan 40885 dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66%. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kerusakan DNA spermatozoa dengan tingkat kebuntingan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% ditemukan tingkat kebuntingan 57,11% dengan pemeriksaan ultrasonografi (USG) pada hari ke-30 dan tingkat kebuntingan 42,80% dengan USG pada hari ke-45. Hasil penelitian pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% ditemukan tingkat kebuntingan 57,11% dengan USG pada hari ke-30 dan tingkat kebuntingan 57,11% dengan USG pada hari ke-45. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan tingkat kerusakan DNA spermatozoa dengan tingkat kebuntingan pada sapi Brahman. Kerusakan DNA spermatozoa berpengaruh terhadap tingkat kebuntingan pada sapi Brahman.

Kata-kata kunci: kerusakan DNA spermatozoa; tingkat kebuntingan; sapi
Brahman

ABSTRACT

The relationship among of sperm DNA damage in cows with pregnancy rates has not been widely studied. The purpose of this study to determine the relationship of sperm DNA damage with pregnancy rate on Brahman cows. The sperm DNA damage rate was measured by *Sperm-Bos-Halomax*[®] from 2 samples of male Brahman bull straw (40002 and 40885) and pregnancy rate was measured from the success rate of artificial insemination. In 14 female Brahman cows divided into two groups. One group of 7 in the artificial insemination with 40002 males with 37.11% sperm DNA damage and one in artificial insemination with 40885 with 10.65% sperm DNA damage. The data obtained were analyzed descriptively by comparing sperm DNA damage with pregnancy rate.

The results showed that at 37.11% sperm DNA damage level was found pregnancy rate 57.11% with ultrasound on 30 day and pregnancy rate 42.80% with ultrasound to 45 day. Result of research on sperm DNA damage level of 10.66% found pregnancy rate 57.11% with ultrasound to 30 day and level pregnancy 57.11% with ultrasound 45 days. The results of this study have concluded that there is a difference in the rate of sperm DNA damage with pregnancy rate in Brahman cows. The sperm DNA damage has an effect on pregnancy rate on Brahman cows.

Keywords : Sperm DNA damage, pregnancy rate, Brahman cow

PENDAHULUAN

Kerusakan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) spermatozoa sangat berpengaruh terhadap fertilisasi, perkembangan preimplantasi dan perkembangan embrio (Lewis dan Aitken., 2005). Tingkat kerusakan DNA spermatozoa sangat berpengaruh terhadap perkembangan embrio (Vassilev *et al.*, 2005) dan kerusakan DNA spermatozoa berkorelasi negatif dengan tingkat kebuntingan (Serafini *et al.*, 2016). Teknologi reproduksi yang telah digunakan untuk meningkatkan populasi sapi dalam negeri adalah inseminasi buatan (IB) dan transfer embrio (TE). Inseminasi buatan di lapangan banyak menggunakan semen beku hasil pembekuan dengan pertimbangan masa simpan lebih lama dan pelaksanaannya lebih mudah dibandingkan dengan semen segar. Namun, permasalahan di lapangan adalah standarisasi pemeriksaan kualitas spermatozoa *post thawing* selama ini yang dilakukan adalah *post thawing motility* (PTM) spermatozoa minimal 40% dan derajat gerakan individu spermatozoa minimal 2 (dua), 1 dari 3 (BSN 2008) sedangkan untuk menjadikan spermatozoa sanggup memfertilisasi sampai menjadi bunting tidak hanya butuh dua pemeriksaan tersebut. Pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa juga lebih penting dari kedua pemeriksaan tersebut, karena kerusakan DNA spermatozoa dapat menyebabkan abortus walaupun terjadi fertilisasi (Vassilev *et al.*, 2005) sehingga kasus *prolong estrus cycle* sering terjadi pada sapi (Nakao *et al.*, 1983). Maka perlunya penambahan parameter pemeriksaan DNA spermatozoa bagi sapi pejantan yang dicurigai terjadi kasus *prolong estrus cycle* di lapangan. Penelitian Enciso *et al.* (2011) melaporkan kerusakan DNA spermatozoa pada sapi Friesian-Holstein sebesar 17,89% dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* dan penelitian Nava-Trujillo *et al.*, (2011) pada sapi brahman melaporkan adanya kerusakan DNA spermatozoa sebesar 4,17±2,69%. Sementara itu

Serafina *et al.* (2016) dengan metode yang sama melaporkan kerusakan DNA spermatozoa pada kerbau sebesar 8±3(6-15%) di Italia, dan kerusakan sebesar itu menyebabkan kebuntingan 57% pada umur kebuntingan 30 hari dan 55% pada umur 45 hari setelah inseminasi buatan.

Standar kerusakan DNA spermatozoa untuk sapi 10-20% tidak direkomendasikan untuk fertilisasi, sedangkan untuk manusia lebih dari 30% (Prinosilova *et al.*, 2012), Sedangkan menurut Evenson DP. (2016) standar kerusakan DNA spermatozoa yang tidak direkomendasikan untuk fertilisasi pada babi 6%, sapi 10-20%, kuda 28% dan manusia 25-30 %. Kerusakan DNA spermatozoa pada manusia jika melebihi 30-40% akan menyebabkan infertilitas dan tidak disarankan untuk dijadikan semen beku (Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2000).

Tingkat kerusakan DNA spermatozoa atau DNA Fragmentasi Indeks (DFI) tertinggi yang ditemukan pada spermatozoa sapi tertinggi pada individu *White Holstein* adalah 10,34% dan terendah pada individu sapi *Polish Black-and-White Holstein* adalah 0,26% (Bochenek dan Smor¹g., 2010). Penelitian Garcia-Macias *et al.*, (2007) melaporkan tingkat kerusakan DNA spermatozoa pada sapi *Friesian Holstein* paling tinggi 19,50± 0,33% dan paling rendah 19,07± 0,41% dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*®. Nilai Sperm DNA Fragmentasi (SDF) 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). Penelitian Meseguer *et al.*, (2011) kerusakan DNA spermatozoa menyebabkan kegagalan kebuntingan sebesar 6,9 % dan sisanya disebabkan oleh faktor lain. Mempertimbangkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan tingkat kerusakan DNA spermatozoa dengan tingkat kebuntingan pada sapi Brahman sangat penting dilakukan.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah semen beku sapi Brahman sebanyak dua *strawa* 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 1 (satu) bulan lebih. Tingkat kebuntingan diukur dari tingkat keberhasilan inseminasi buatan (IB) pada 14 ekor sapi Brahman betina yang dibagi menjadi dua kelompok. Satu kelompok sebanyak tujuh ekor di IB dengan pejantan 40002 dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% dan satu kelompok lagi di IB dengan pejantan 40885 dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66%.

Pengujian Motilitas Spermatozoa

Sebanyak 10 μ L semen diambil menggunakan mikrotub diteteskan pada gelas objek yang telah dihangatkan kemudian ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 100 kali dan 400 kali pada 10 lapang pandang. Penilaian diberikan dalam kisaran 0-100%.

Pengujian Viabilitas (Spermatozoa Hidup dan Mati)

Sebanyak 10 μ L semen diletakkan pada gelas objek, ditambah pewarna Eosin-Nigrosin 20 μ L, dihomogenkan dan dibuat preparat ulas dari campuran tersebut dalam waktu 15 detik, dan dikeringkan di atas meja penghangat hingga kering. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya menggunakan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna dan spermatozoa yang mati menyerap warna. Spermatozoa yang hidup dan mati dihitung dalam 10 lapang pandang. Persentase spermatozoa hidup dihitung menggunakan rumus: Spermatozoa hidup (%) = (jumlah spermatozoa hidup) x (jumlah total spermatozoa yang dihitung)⁻¹ x 100%.

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

Urutan pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa sapi menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* dilakukan sebagai berikut, langkah pertama encerkan semen dengan konsentrasi akhir 15-20 juta sel /mL dalam *Phosphate*

Buffered Saline (PBS). Langkah berikutnya agarose dilelehkan dalam penangas air/*water bath* (90-100°C) selama 5 menit kemudian agarose diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Semen sebanyak 25 μ L diambil dan dimasukkan ke dalam agarose (*mixing*). Suspensi semen sebanyak 25 μ L kemudian diteteskan gelas objek sebanyak 25 μ L, kemudian tutup dengan gelas penutup. Preparat tersebut diinkubasi dalam kulkas selama 5 menit. Gelas penutup preparat tersebut diangkat secara perlahan kemudian diteteskan dengan *Lysis Solution (LS)* hingga agarose terendam, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Preparat tersebut kemudian diinkubasi dalam aquadest selama 5 menit.

Preparat tersebut selanjutnya diinkubasi dalam etanol 70%, 90%, 100% (masing-masing dalam waktu 4 menit). Selanjutnya preparat dikeringanginkan. Kemudian preparat kembali diinkubasi dalam aquadest selama 5 menit, kemudian dikeringanginkan. Lalu dilakukan pewarnaan/*staining* terhadap preparat. Mula-mula preparat dicelupkan dalam kotak (*staining jar*) berisi pewarna *Eosin* selama 5 menit, kemudian cuci menggunakan aquadest dalam kotak selama 2 (dua) menit. Preparat kemudian dicelupkan dalam kotak berisi pewarna *Methylene Blue* selama 5 (lima) menit kemudian cuci menggunakan aquadest dalam kotak selama 2 (dua) menit. Lalu amati preparat di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dengan menggunakan *green filter*. Pemeriksaan dilakukan terhadap 500 spermatozoa untuk setiap sampel (Garcia-Macias *et al.*, 2007).

Pemeriksaan Ultrasonografi (USG)

Semen beku sapi Brahman dalam straw dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa (57,11% dan 10,66%) digunakan untuk melakukan inseminasi buatan (IB) pada 14 ekor sapi Brahman betina yang telah diseleksi performans reproduksinya dengan rata-rata estrus pertama kali setelah melahirkan. Pemeriksaan kebuntingan dilakukan menggunakan ultrasonografi (USG) dilakukan dengan alat USG *portable* Model WED 3000V (PT. Golden Lab International) dilakukan pada hari ke-30 dan hari ke-45 setelah IB. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan tingkat kerusakan DNA spermatozoa dengan tingkat kebuntingan pada sapi Brahman.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis kerusakan DNA spermatozoa dapat mengungkapkan gangguan fertilitas pada pejantan selain pemeriksaan motilitas dan viabilitas. Kerusakan DNA spermatozoa dapat menyebabkan kematian embrio dini dan abortus. Kerusakan DNA spermatozoa sangat berpengaruh terhadap, kualitas spermatozoa, tingkat fertilisasi, perkembangan preimplantasi dan perkembangan embrio (Lewis dan Aitken., 2005). Tingkat kerusakan DNA spermatozoa sangat berpengaruh terhadap perkembangan embrio dan menyebabkan keguguran (Vassilev *et al.*, 2005) dan kerusakan DNA spermatozoa berkorelasi negatif dengan tingkat kebuntingan (Serafini *et al.*, 2016; Duran *et al.*, 2002). Semakin tinggi tingkat kerusakan DNA spermatozoa maka semakin rendah tingkat kebuntingannya. Kematian embrio akan menyebabkan *prolong estrus cycle* pada hari ke 30 sampai hari ke 60 setelah inseminasi buatan (Nakao *et al.*, 1983). Keberhasilan IB rata-rata 70% yang menjadi bunting. Sisa yang 30% mengalami kegagalan kebuntingan karena banyak faktor salah satunya kematian embrio (65% dari 30%). Kematian embrio paling banyak terjadi pada hari ke 6 sampai hari ke 18 setelah fertilisasi (Vassilev *et al.*, 2005).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% ditemukan tingkat kebuntingan 57,11% dengan USG pada hari ke-30 dan tingkat kebuntingan 42,80% dengan USG pada hari ke-45. Hasil penelitian pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% ditemukan tingkat kebuntingan 57,11% dengan USG pada hari ke-30 dan tingkat kebuntingan 57,11% dengan USG pada hari ke-45 (Tabel 1; Gambar 1). Hal ini mirip penelitian Serafini *et al.* (2016) yang melaporkan kerusakan DNA spermatozoa pada kerbau sebesar 8 ± 3 (6-15%) di Italia dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax* menyebabkan kebuntingan 57% pada umur

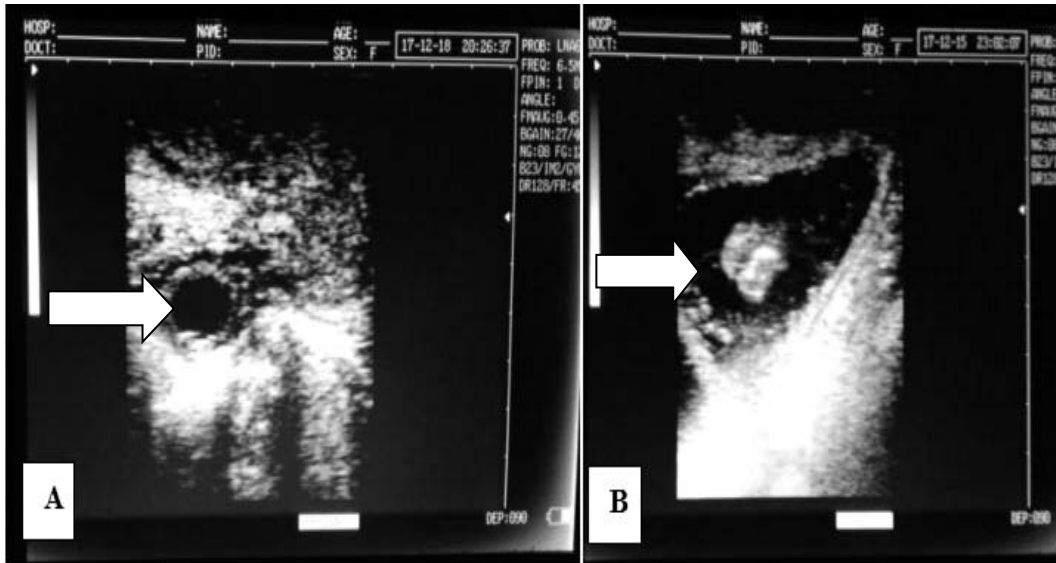
kebuntingan 30 hari dan menyebabkan kebuntingan 55% pada umur kebuntingan 45 hari setelah inseminasi buatan. Pada penelitian Serafini *et al.*, (2016), kerusakan DNA spermatozoa 8 ± 3 (6-15%) hanya menyebabkan keguguran 2% pada kerbau sedangkan penelitian ini pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% tidak menyebabkan keguguran walaupun tingkat kebuntingan lebih tinggi mencapai 57,11%, hal ini kemungkinan disebabkan oleh species yang berbeda, jumlah sampel dan lingkungan yang berbeda pula.

Pada penelitian ini ditemukan adanya keguguran pada tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11%, sebesar 14,31%. Vassilev *et al.* (2005) juga melaporkan terjadi keguguran 18,87% pada umur kebuntingan hari ke-45. Hasil ini bertentangan dengan pendapat Rybar *et al.*, (2004) yang menyatakan standar kerusakan DNA spermatozoa untuk sapi 10% sampai 20% tidak direkomendasikan untuk fertilisasi sedangkan untuk manusia lebih dari 30% (Rybar *et al.*, 2004). Menurut Evenson (2016) standar kerusakan DNA spermatozoa yang tidak direkomendasikan untuk fertilisasi pada babi 6%, sapi 10-20%, kuda 28% dan manusia 25-30%. Kerusakan DNA spermatozoa pada manusia jika melebihi 30-40% dapat menyebabkan keguguran dan tidak disarankan untuk dijadikan semen beku (Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2000).

Nilai *Sperm DNA Fragmentation* (SDF) 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). Penelitian Meseguer *et al.* (2011) melaporkan bahwa kerusakan DNA spermatozoa menyebabkan kegagalan kebuntingan sebesar 6,9% dan sisanya disebabkan oleh faktor lain. Bagaimana pun peningkatan kerusakan DNA spermatozoa dapat menyebabkan penurunan tingkat kebuntingan (Ortiz *et al.*, 2017).

Tabel 1. Hubungan kerusakan DNA spermatozoa dengan tingkat kebuntingan

Kode Pejantan	Motilitas	Viabilitas	Kerusakan DNA	USG Hari ke-30	USG Hari ke-45
40002	40 %	26,53%	37,11%	57,11%	42,80%
40885	40 %	61,81%	10,66%	57,11%	57,11%



Gambar 1. Citra USG perkembangan kebuntingan sapi (A) umur 30 hari (B) umur 45 hari (Tanda panah menunjukkan adanya kebuntingan).

Kematian embrio sering terjadi pada hari 20-22 setelah inseminasi buatan, dan induk sapi akan kembali estrus pada hari ke-30 sampai hari 60 setelah inseminasi buatan (Nakao *et al.*, 1983). Kematian embrio bisa disebabkan oleh kerusakan DNA spermatozoa (Lewis dan Aitken., 2005) dan juga bisa disebabkan oleh hormon progesteron yang kurang (Nakao *et al.*, 1983). Penelitian-penelitian sebelumnya juga merekomendasikan perlunya standarisasi tingkat kerusakan DNA spermatozoa untuk inseminasi buatan, namun nilai tingkat kerusakan yang diajukan cenderung lebih rendah, hal ini disebabkan karena penelitian umumnya dilakukan di negara empat musim, sedangkan di Indonesia memiliki iklim tropis yang cenderung panas. Lingkungan dengan suhu yang tinggi akan berakibat pada kerusakan DNA spermatozoa (Evenson, 2016) yang berpengaruh pada suhu testis (Lestari dan Sari, 2015).

SIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan tingkat kerusakan DNA spermatozoa dengan tingkat kebuntingan pada sapi Brahman. Kerusakan DNA spermatozoa berpengaruh terhadap tingkat kebuntingan. Kerusakan DNA spermatozoa 10,66 % tidak menyebabkan keguguran/abortus pada sapi Brahman. Kerusakan DNA spermatozoa 37,11 % menyebabkan keguguran/

abortus pada sapi Brahman 14,31% pada umur kebuntingan 45 hari. Kerusakan DNA spermatozoa 37,11 % tidak disarankan untuk digunakan inseminasi buatan pada sapi Brahman.

SARAN

Penelitian ini masih tahap awal disarankan dapat dilanjutkan ke tahap fertilisasi *in vitro* sebagai pembandingan tingkat perkembangan embrio berikutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada 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 (BIB) Sembawa Banyuasin, Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang Bandung dan Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU) Sembawa Banyuasin yang telah memberikan penggunaan fasilitas untuk melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Standardisasi Nasional. Semen Beku Sapi. SNI 4869, 1:2008.

- Bochenek M, Smorag Z. 2010. Effect of antioxidant added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reproductive Biology*. 3(1): 81-87.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction*. 17(12): 3122-8.
- 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.
- 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.
- 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 Pa P, Martínez Pastor F, Álvarez 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. *International Journal of Andrology* 30(2): 88-98.
- Halotech DNA. Madrid chamber of commerce. [Internet]. [diunduh 2014 Mei 24]. Tersedia pada : (<http://www.halotechdna.com/en/products/halomax>).
- 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.
- Lestari SW, Sari T. 2015. Fragmentasi DNA Spermatozoa: Penyebab, Deteksi, dan Implikasinya pada Infertilitas Laki-Laki. *E Journal Kedokteran Indonesia* 3(2): 152-160.
- Lewis SE, Aitken RJ. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 322(1): 33-41.
- 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.
- Nakao T, Sugihashi A, Kawata K, Saga N, Tsunoda N. 1983. Milk progesterone levels in cows with normal or prolonged estrous cycles, referenced to an early pregnancy diagnosis. *Japanese Journal of Veterinary Science* 45(4): 495-499.
- 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.
- Ortiz I, Urbano M, Dorado J, Morrell JM, Al-Essawe E, Johannisson A, Hidalgo M. 2017. Comparison of DNA fragmentation of frozen-thawed epididymal sperm of dogs using Sperm Chromatin Structure Analysis and Sperm Chromatin Dispersion test. *Animal Reproduction Science* 187: 74-78.
- Prinosilova P, Rybar R, Zajicova A. 2012. DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Veterinarni Medicina* 57 (3): 133-142.
- Serafini R, Love CC, Coletta A, Mari G, Mislei B, Caso C, Di Palo R. 2016. Sperm DNA integrity in frozen-thawed semen from Italian Mediterranean Bufallo bulls and its relationship to in vivo fertility. *Animal Reproduction Science* 172: 26-31.
- Spano JP, Adam R, Haller G, Poston G, Raoul JL, Tabernero J. 2000. Toward optimized front-line therapeutic strategies in sperm with metastatic. *Japanese Journal of Veterinary Science* 39 (3): 335-412
- Vassilev N, Yotov S, Dimitrov F. 2005. Incidence of early embryonic death in dairy cows. *Trakia J of Scie* 3(5): 62-64.

