

Perbandingan Pemeriksaan Kerusakan DNA Spermatozoa *Post Thawing* antara *Sperm-Bos-Halomax*[®] dan *Toluidine Blue*

Comparison of Post Thawing Spermatozoa DNA Damage Examination Between Sperm-Bos-Halomax[®] and *Toluidine Blue*

L. Priyanto¹, A. Budiyanto², A. Kusumawati², Kurniasih² & I. Arifiantini³

¹Program Studi Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya Palembang Sumatera Selatan.

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta DIY.

³Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor Jawa Barat.

E-mail: langgeng.priyanto@mail.ugm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan penilaian kerusakan DNA spermatozoa menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*[®] dan *Toluidine Blue* pada spermatozoa sapi *post thawing*. Hasil penelitian pada spermatozoa sapi menunjukkan bahwa perbandingan persentase kerusakan DNA spermatozoa setelah *thawing* menunjukkan bahwa *Sperm-Bos-Halomax*[®] (14.56±7.52%) lebih tinggi dibandingkan dengan *Toluidine Blue* (07.94±2.41%) (P<0.05). Kesimpulan yang diperoleh dalam penelitian ini adalah *Sperm-Bos-Halomax*[®] lebih cepat, akurat dan sensitif dibandingkan dengan *Toluidine Blue* untuk mendeteksi kerusakan DNA spermatozoa. Hasil tingkat kerusakan DNA spermatozoa pada sapi pejantan yang digunakan dalam penelitian ini masih standar kenormalan dan dapat digunakan untuk inseminasi buatan.

Kata kunci : Kerusakan DNA, Spermatozoa, *Sperm-Bos-Halomax*[®], *Toluidine Blue*

ABSTRACT

The study was aims to determine the assessment of DNA damage in spermatozoa using *Sperm-Bos-Halomax*[®] and *Toluidine Blue* stain in bull spermatozoa of *post thawing*. The findings demonstrated that the percentage ratio of spermatozoa DNA damage after *thawing* showed that *Sperm-Bos-Halomax*[®] (14.56 ± 7.52%) was higher than *Toluidine Blue* (07.94 ± 2.41%) (P < 0.05). By way of conclusion, after all, obtained in this line of research devoted that *Sperm-Bos-Halomax*[®] was faster, more accurate and sensitive compared to *Toluidine Blue* in detecting spermatozoa DNA damage. As well, its results especially in bulls employed in the recent study was still standardized and might be used for artificial insemination.

Key words : DNA Damage, Spermatozoa, *Sperm-Bos-Halomax*[®] and *Toluidine Blue*

PENDAHULUAN

Standardisasi pemeriksaan kualitas spermatozoa post thawing selama ini yang dilakukan adalah post thawing motility. Motilitas spermatozoa minimal 40 % dan derajat gerakan individu spermatozoa minimal 2 (dua), 1 dari 3 (SNI 2008) sedangkan untuk mengukur daya fertilisasi spermatozoa tidak cukup dua pemeriksaan tersebut. Pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa lebih penting dari kedua pemeriksaan tersebut, karena kerusakan DNA spermatozoa akan menyebabkan abortus walaupun terjadi fertilisasi (Vassilev *et al.* 2005) sehingga kasus *prolong estrus cycle* sering terjadi pada sapi.

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 termasuk *Cytochemical Assays* terbukti sensitif untuk menguji struktur dan kemas pembungkus DNA atau kromatin (Erenpreisa *et al.* 2003; Prinosilova *et al.* 2012; Beletti *et al.* 2005). Teknik ini selain sensitif, sederhana dan murah serta tidak membutuhkan alat yang khusus seperti *Flow Cytometry* (Kim *et al.* 2013). Pewarnaan TB telah digunakan selama 40 tahun untuk mendiagnosis suatu penyakit yaitu mendeteksi adanya keganasan pada sel mukosa (Bobot 2011) dan juga dipakai dalam pewarnaan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Toluidine Blue adalah pewarnaan DNA yang digunakan untuk mengevaluasi integritas kromatin spermatozoa dengan

mendeteksi ada tidak pecahnya ikatan disulfida di dalam kromatin. Dengan demikian, kepala spermatozoa yang menunjukkan warna biru tua mengindikasikan kerusakan dari DNA spermatozoa. Teknik pewarnaan ini telah digunakan untuk mengevaluasi integritas kromatin spermatozoa pada beberapa spesies antara lain sapi, kuda, kelinci, kerbau dan manusia (Erenpreisa *et al.* 2003; Beletti *et al.* 2005). Pada manusia pewarnaan TB menunjukkan korelasi yang tinggi dengan *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TUNEL) dan *Acridine Orange* (Erenpreisa *et al.* 2003). Pemeriksaan ini berdasarkan kondisi dari kondensasi kromatin berupa perbedaan intensitas warna yang dihasilkan. Perubahan ini akan menentukan kualitas proses kondensasi kromatin yang dapat dideteksi melalui pewarnaan TB. 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, akibat apoptosis, kurangnya protein terutama arginin dan sistin, infeksi, stres, paparan zat kimia beracun, hipertermia testis dan hormonal (Aitken *et al.* 1998). Selain teknik pewarnaan TB, pada saat ini dipasaran juga tersedia kit untuk melihat kerusakan DNA di antaranya adalah *Sperm-Bos-Halomax*[®] (Halotech DNA SL Madrid Spanyol) dan

telah digunakan untuk mendeteksi kerusakan DNA pada sapi dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* dan mikroskop cahaya (García-Macías *et al.* 2007). *Sperm-Bos-Halomax*[®] adalah kit diagnostik *in vitro* yang digunakan untuk pengukuran kerusakan DNA spermatozoa yang terfragmentasi pada spesies hewan yang berbeda. *Sperm-Bos-Halomax*[®] dapat mengevaluasi kualitas spermatozoa yang lebih baik.

Hasil analisis *Sperm-Bos-Halomax*[®] didasarkan pada respon DNA yang terfragmentasi dan yang tidak terfragmentasi dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* dan mikroskop cahaya. *Sperm Chromatin dispersion* (SCD) test dengan *Sperm-Bos-Halomax*[®] (Halotech DNA, Madrid, Spain) adalah kit diagnostik *in vitro* yang digunakan untuk pengukuran kerusakan DNA spermatozoa pada sapi dan hewan lainnya *Sperm-Bos-Halomax*[®] dapat mengevaluasi kualitas spermatozoa yang lebih baik.

Hasil analisis *Sperm-Bos-Halomax*[®] didasarkan pada respon DNA yang rusak dan yang tidak rusak dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* dan mikroskop cahaya. DNA spermatozoa yang rusak akan kelihatan 'halo' dengan kepala spermatozoa berpendar, sedangkan sel dengan DNA yang tidak rusak kepala akan terlihat kompak tanpa 'halo' disekitar kepala spermatozoa (Gambar 2). Semakin tinggi DNA yang rusak atau terfragmentasi (SDF), maka semakin besar kemungkinan hewan betina akan mengalami keguguran.

Sperm-Bos-Halomax[®] kit ini dipakai untuk mengukur nilai Sperm DNA

Fragmentasi (SDF). Penelitian Karoui *et al.* (2012) pada sapi ditemukan kerusakan DNA spermatozoa sekitar 7% sampai 10% dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan inseminasi buatan yang paling rendah dengan menggunakan

Sperm-Bos-Halomax[®]. Pemeriksaan DNA spermatozoa pada kuda dengan *Sperm-Bos-Halomax*[®] dilaporkan juga oleh Langdon (2012) sebesar 13 % dinyatakan normal dan dinyatakan tidak normal sebesar 42 %. Serafini *et al* (2016) melaporkan kerusakan DNA spermatozoa pada kerbau dikatakan normal sebesar 8 ± 3 (6-15%) di Italia dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*[®].

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan penilaian kerusakan DNA spermatozoa menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*[®] dan *Toluidine Blue* pada spermatozoa sapi setelah thawing

BAHAN DAN METODE

Materi Penelitian

Sampel berupa semen beku dari delapan ekor sapi terdiri atas Brahman, Ongole, Limosin dan Simental masing-masing dua ekor dengan tiga kali koleksi dan prosesi (n=24). Sapi-sapi tersebut milik BIB Lembang dan dipelihara dengan standar BIB yang baik. Proses koleksi, evaluasi sampai produksi semen beku dilakukan di BIB Lembang, sedangkan pengujian *post thawing* di lakukan di URR FKH IPB dan BIB Sembawa Banyuasin Sumatera Selatan.

Metode Penelitian

Koleksi, Evaluasi dan Pengolahan Semen

Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dua kali seminggu. Semen segar selanjutnya dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi, volume, warna, pH dan konsistensi dan mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas dan konsentrasi spermatozoa mengacu kepada (Arifiantini, 2012) dan kerusakan DNA spermatozoa. Selanjutnya dilakukan pembekuan dan penyimpanan di N₂ cair sampai dilakukan pemeriksaan berikutnya.

Pembekuan Semen

Semen yang memiliki motilitas spermatozoa >70% dengan konsentrasi >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 kemudian dilakukan pemeriksaan DNA spermatozoa.

Pengujian Kerusakan DNA Spermatozoa Post Thawing

Pengujian dengan *Toluidine Blue* (TB)

Semen *post thawing* diambil satu tetes dan dibuat preparat ulas, pada 4 buah gelas objek. Preparat selanjutnya dikeringudarkan dan difiksasi di dalam etanol 96% - aseton (1:1) selama 30 menit pada suhu 4 °C. Setelah difiksasi, preparat dikering udarkan, selanjutnya dihidrolisis di dalam HCl 0.1 N selama 5 menit pada suhu 4 °C. selanjutnya preparat dibilas tiga kali menggunakan aquadest.

Preparat selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan TB 0,05% selama 10 menit. Preparat yang telah diwarnai dicuci kembali dengan aquadest dan didehidrasi dengan menggunakan *t-butanol* dua kali serta dibersihkan menggunakan *xylol* sebanyak dua kali. Preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X. Kepala spermatozoa yang integritas kromatinnya masih baik akan berwarna biru terang, sedangkan spermatozoa yang integritas kromatinnya sudah berkurang akan berwarna biru tua. Pemeriksaan dilakukan terhadap 100 spermatozoa untuk setiap sampel (Erenpreisa et al. 2003).

Pengujian dengan *Sperm-Bos-Halomax*[®]

Sperm-Bos-Halomax[®] pada prinsipnya memeriksa de kondensasi diferensial kromosom DNA spermatozoa. Spermatozoa yang mengalami kerusakan DNA akan berpedar bentuk halo didaerah kepala, sedangkan yang tidak rusak daerah kepala tidak berpedar. Berdasarkan bentuk halo dapat dibedakan menjadi 2 kriteria yaitu yang berbentuk halo (berpedar) yang menunjukkan kerusakan DNA pada spermatozoa dan yang

tidak menunjukkan halo (tidak berpendar) untuk DNA spermatozoa yang utuh.

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 semen dengan konsentrasi akhir 15-20 juta sel /mL dalam *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Langkah berikutnya agarose dalam *water bath* dilelehkan pada suhu (90 °C-100 °C) selama 5 menit kemudian agarose dilelehkan pada suhu 37 °C selama 5 menit. Lalu 25 µL semen diambil dan dimasukkan dalam agarose (*mixing*). Suspensi semen kemudian dimasukkan dalam gelas objek sebanyak 25 µL, kemudian tutup dengan gelas penutup. Inkubasi preparat dalam kulkas selama 5 menit. Lalu angkat perlahan gelas penutup kemudian teteskan dengan *Lysis Solution* (LS) hingga agarose terendam, inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Preparat diinkubasi dalam aquadest selama 5 menit. Inkubasi preparat dalam etanol 70%, 90%, 100% (masing-masing dalam waktu 4 menit). Kemudian lakukan pengeringan preparat. Preparat kemudian diinkubasi dalam aquadest selama 5 menit, kemudian lakukan pengeringan. Lakukan staining preparat: Inkubasi preparat dalam kotak berisi pewarna *Eosin* selama 5 menit, kemudian cuci menggunakan aquadest dalam kotak selama 2 (dua) menit. Inkubasi preparat 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 perbesaran 400x dengan menggunakan *green filter*. Pemeriksaan dilakukan terhadap 500 spermatozoa untuk setiap sampel.(Garcia-Macias *et al.* 2007).

Analisa Data

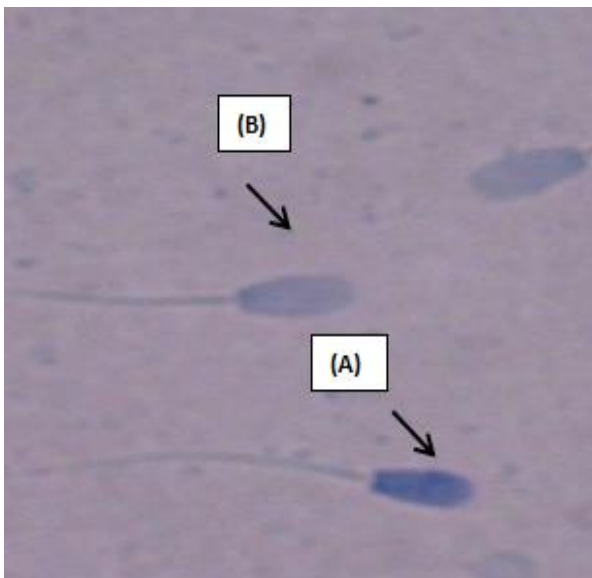
Penelitian ini dirancang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Sampel berupa semen beku berasal dari delapan ekor sapi terdiri atas Brahman, Ongole, Limosin dan Simental masing-masing dua ekor dengan tiga kali koleksi dan prosesing (n=24). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *one sample t test* dengan bantuan program *software* SPSS 16 (SPSS., Chicago, IL, USA) dan *Microsoft excel*. Data disampaikan dalam rata-rata dan standar deviasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian DNA menggunakan TB pada prinsipnya mengevaluasi struktur kromatin DNA (Kim *et al.* 2013), sehingga DNA spermatozoa yang rusak akan berwarna biru tua dan yang masih utuh akan berwarna biru terang (Gambar 1), sedangkan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*[®] prinsipnya adalah melihat fragmentasi DNA spermatozoa (Sperm DNA fragmentation indeks; SDFi). Fragmentasi DNA ini terlihat dari keluarnya kromatin dari sel, sehingga membentuk ‘halo’ dan berpendar untuk spermatozoa yang rusak DNA dan tidak menunjukkan ‘halo’ tidak berpendar untuk spermatozoa dengan DNA yang utuh (Langdon 2012). *Sperm-Bos-Halomax*[®] dapat digunakan sebagai kontrol kualitas spermatozoa yang disebabkan oleh kerusakan DNA misalnya

yang disebabkan oleh media pengencer semen, krioprotektan, pembekuan, pakan, suhu testis dan manipulasi penanganan spermatozoa lainnya seperti prosedur *sexing* spermatozoa .

Hasil pemeriksaan dengan *Toluidine Blue* tingkat kerusakan DNA spermatozoa pada sapi Brahman rata-rata $6,83 \pm 1,25\%$ dengan hasil penelitian Nava-Trujillo *et al.* (2011) pada sapi Brahman $4,17 \pm 2,69\%$ (Tabel 1). Tingkat SDFi tertinggi yang ditemukan pada spermatozoa 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). Penelitian Meseguer *et al.* (2011) kerusakan DNA spermatozoa menyebabkan kegagalan kebuntingan sebesar 6,9% dan sisanya disebabkan oleh faktor lain.



Gambar 1. Pewarnaan TB spermatozoa dengan DNA rusak warna biru tua (A) Spermatozoa dengan DNA utuh warna biru terang (B) (Pembesaran 400x)

Beberapa faktor yang dapat memengaruhi kerusakan dan kualitas DNA, menurut Morrell 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).

Penelitian ini *Sperm-Bos-Halomax*[®] yang hasilnya ternyata lebih mudah dianalisis dan memberikan gambaran yang cukup akurat (Gambar 2). Kerusakan DNA spermatozoa pada semen beku dari empat bangsa yang diuji antara pewarnaan *Toluidine Blue* (TB) dan *Sperm-Bos-Halomax*[®] berbeda nyata ($P < 0.05$) (Tabel 1).

Pengujian lebih lanjut menunjukkan bahwa setiap bangsa berbeda tingkat kerusakan DNANYa. Sapi Brahman menunjukkan kerusakan DNA paling rendah sebesar $06,83 \pm 1,25\%$ dan paling tinggi sapi Simental sebesar $09,34 \pm 3,76\%$ dengan pemeriksaan TB.

Sapi Limosin menunjukan kerusakan DNA paling rendah $11,06 \pm 6,56\%$ dan paling tinggi sapi Simental $19,68 \pm 11,24\%$ dengan pemeriksaan *Sperm-Bos-Halomax*[®]. Rerata dari keempat bangsa yang diuji antara pewarnaan TB adalah $07,94 \pm 2,41\%$ dan *Sperm-Bos-Halomax*[®] adalah $14,56 \pm 7,52\%$. Dilihat dari hasil penelitian ini terlihat

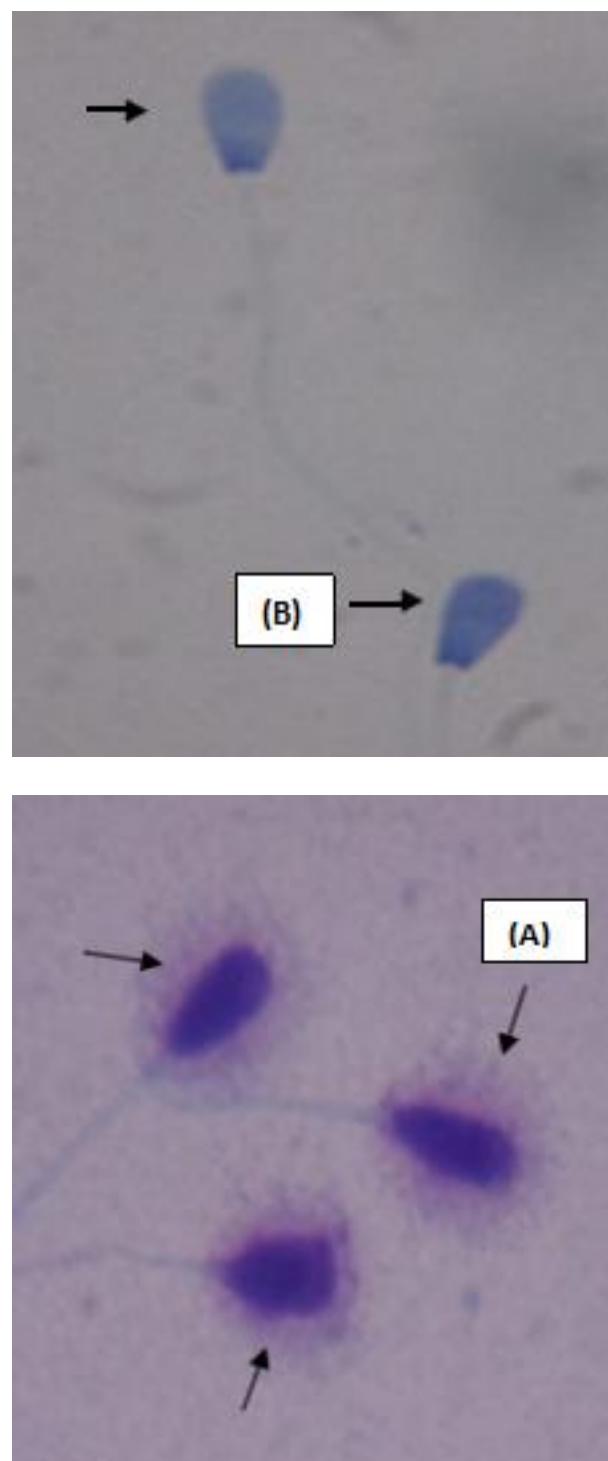
Sperm-Bos-Halomax[®] lebih sensitif dari pada pemeriksaan dengan TB.

Enciso *et al.* (2011) melaporkan kerusakan DNA spermatozoa pada sapi Friesian-Holstein sebesar 17,89% dengan menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*[®] masih dikatakan normal. Penelitian 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. Jadi tingkat keutuhan DNA spermatozoa sapi BIB Lembang sebesar 14,56±7,52% masih normal dengan pemeriksaan *Sperm-Bos-Halomax*[®]. *Kit Halomax* lebih sensitif tetapi kelemahannya adalah membutuhkan biaya yang besar.

Pengujian DNA penting dilakukan karena dapat memengaruhi kemampuan spermatozoa dalam fertilisasi dan perkembangan embrio (Ahmadi *et al.* 1999). Tingkat kerusakan DNA spermatozoa pada manusia lebih dari 30% akan menurunkan fertilitas (Larson *et al.* 2003).

Kerusakan DNA spermatozoa sapi BIB Lembang sebesar 14,56±7,52% masih diambang batas normal. Hal ini diperkuat dari penelitian Enciso *et al.* (2011) yang sama-sama menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*[®] di dalam pemeriksaan DNA spermatozoa sapi (17,89%) dan penelitian Langdon (2012) pada kuda (13%). Serafini *et al.* (2016) 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 45 hari setelah inseminasi buatan.



Gambar 2. Pengujian *Sperm-Bos-Halomax*[®] spermatozoa dengan DNA utuh kepala spermatozoa tidak berpendar (A) spermatozoa dengan DNA rusak kepala spermatozoa berpendar (B) (Pembesaran 400x).

Tabel 1. Pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa sapi dengan menggunakan Uji *Sperm-Bos-Halomax*[®] dan *Toluidine Blue* (Rerata±SD)

Bangsa Sapi	Jumlah (n)	DNA Spermatozoa yang Rusak (%)	
		<i>Sperm-Bos-Halomax</i> [®]	<i>Toluidine Blue</i>
Brahman	6	12,67±2,73 ^a	06,83±1,25 ^b
Simental	6	19,68±11,24 ^a	09,34±3,76 ^a
Limosin	6	11,06±6,56 ^a	07,89±2,39 ^a
Ongole	6	14,81±5,72 ^a	07,69±1,17 ^b
Rataan	24	14,56±7,52 ^a	07,94±2,41 ^b

Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata $P < 0.05$

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini dapat diambil beberapa kesimpulan yaitu sebagai berikut Pengujian menggunakan *Sperm-Bos-Halomax*[®] lebih sensitif untuk menentukan kerusakan DNA spermatozoa pada sapi dibandingkan dengan *Toluidine Blue*. Kerusakan DNA spermatozoa sebesar 7,94% dengan pewarnaan *Toluidine Blue* dan 14,56% dengan *Sperm-Bos-Halomax*[®] masih dalam kerusakan standar dan masih dapat digunakan untuk inseminasi buatan. Disarankan pengujian DNA dapat dilakukan pada sapi-sapi yang mempunyai fertilitas yang rendah dan yang mempunyai rekam medis *prolong estrus cycle* disetiap *post* inseminasi buatan agar penanganan dapat cepat dilakukan.

UCAPAN TERIMAKASIH

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 Lembang Bandung, Balai Inseminasi Buatan Sembawa Banyuasin Sumatera Selatan dan Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR) FKH IPB yang telah memberikan penggunaan fasilitas untuk melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi A, Ng SC.** 1999. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Human Reproduction*, 14(9):2279-2285.
- Aitken R, Krausz C.** 2001. Oxidative stress DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 122:497-506.
- Arifiantini RI.** 2012. *Teknik koleksi dan evaluasi semen pada hewan*. Bogor, IPB Press.
- 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.

- Badan Standardisasi Nasional.** Semen Beku Sapi. SNI 4869, 1:2008.
- 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 (ID): Universitas Gadjah Mada.
- 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 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.
- 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.
- 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.
- Langdon WC.** 2012. *A comparative study on equine sperm chromatin using the sperm chromatin structure assay and the sperm halomax kit®* (disertasi). Texas (USA). Texas Tech University.
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP.** 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fer Ster.* 80:895-902.
- 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.
- Nava-Trujillo H, Quintero-Moreno A, Finol-Parra G, Carruyo G, Vilchez-Siu V, Osorio-Melendez C, Rubio-Guillen J, Valeris-Chacin R.** 2011. Relationship among damage chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. *Colombiana J of anim science and vet med.* 24(2):1-8.
- Prinosilova P, Rybar R, Zajicova A, Hlavicova J.** 2012. DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Vet Med.* 57(3):133-142.

- Rodríguez-Martínez H.** 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev.* 19:91-101.
- Saili T.** 2006. *Morfologi dan Integritas DNA Spermatozoa Domba Setelah Diawetkan dengan Metode Pengeringan beku.* (disertasi). Bogor (ID):Institut Pertanian Bogor.
- 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 Buffalo bulls and its relationship to in vivo fertility. *Animal reproduction science*, 172:26-31.
- Vassilev N, Yotov S, Dimitrov F.** 2005. Incidence of early embryonic death in dairy cows. *Trakia J of Scie.* 3(5):62-64.
- Wykes SM, Krawetz SA.** 2003. The structural organization of sperm chromatin. *The J of Biol Chem.* 278(32):29471-29477.