

Pengembangan Metode Identifikasi Kerusakan DNA Spermatozoa Ternak

Development Method of Livestock Sperm DNA Damage Identification

Teguh Ari Prabowo,¹ R. Iis Arifiantini,² Dondin Sajuthi,³ Uus Saefullah⁴

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Divisi Reproduksi, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Divisi Penyakit Dalam, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

⁴Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor

E-mail: teguhariprabowo@yahoo.com

Abstract

The success of artificial insemination is very much determined by the quality of spermatozoa. The detection or identification of damaged chromatin of spermatozoa DNA is very important to foresee the adverse clinical outcome. However, the method of identification is still depended on expensive imported kits. Therefore, the objective of this research was to developed an identification kit to determine the quality of livestock spermatozoa DNA chromatin. This study consist of three step. Step 1) Determination of low melting point agarose (LMP-agarose) concentration which is 0,6%, 0,7% and 0,8%. 2) Comparison of three lysis solution (LS) which is LS I (0.4M Tris, 0.8M DTT, 1% SDS, pH 7.5), LS II (0.4M Tris, 2 M NaCl, 1% SDS, pH 7.5), and LS III (0.4M Tris-HCl, 2M NaCl, 1% SDS 0,05 M EDTA, pH 7.5). 3) Comparison different staining which is Eosin yellow and Methylene blue. The results showed that 0.6% LMP-agarose demonstrated the best concentration to “trapped the spermatozoa” compared for sheep and goats. whereas the three concentration of spermatozoa cows can not be used to trap spermatozoa cow. The best formulation to lysis the membrane was LS III (0.4M Tris -HCl, 2M NaCl, 1% SDS 0,05 M EDTA). The best staining was eosin yellow and methylene blue with 2:1 ratio.

Keywords: Chromatin, spermatozoa, LMP-agarose, lysis solution, staining

Abstrak

Keberhasilan program Inseminasi Buatan (IB) ditentukan oleh kualitas spermatozoa, salah satunya adalah identifikasi kerusakan kromatin DNA. Identifikasi kerusakan kromatin DNA sangat penting dilakukan untuk mengetahui kegagalan yang dipengaruhi oleh faktor klinik reproduksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan kit identifikasi kerusakan kromatin DNA spermatozoa ternak yang saat ini masih impor dengan harga yang mahal. Penelitian terdiri dari tiga tahap, tahap I penentuan konsentrasi *Low Melting Point-agarose* (LMP-*agarose*), tahap II penentuan *lysis solution* (LS), dan tahap III pengujian pewarnaan kromatin DNA spermatozoa. Konsentrasi LMP-*agarose* yang digunakan adalah 0,6%, 0,7% dan 0,8%. Konsentrasi terbaik selanjutnya dilisiskan menggunakan tiga jenis LS, diantaranya jenis LS, ke satu (0,4M Tris, 0,8M DTT, 1% SDS), jenis LS ke dua (0,4M Tris, 2M NaCl, 1% SDS), dan jenis LS ke tiga (0,4M Tris-HCl, 2 MNaCl, 1% SDS 0,05M EDTA) sedangkan untuk pengujian pewarnaan kromatin DNA menggunakan pewarnaan Eosin *yellow* (Eosin *Y*), Eosin dan *Methylene blue*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 0,6% LMP-*agarose* merupakan konsentrasi *agarose* terbaik yang dapat digunakan untuk menjebak spermatozoa domba dan kambing, sedangkan pada spermatozoa sapi ketiga konsentrasi tersebut tidak dapat digunakan untuk menjebak spermatozoa. *Lysis solution* (LS) terbaik adalah LS formulasi ke tiga (0,4M Tris-HCl, 2M NaCl, 1% SDS 0,05M EDTA, pH 7,5.), sedangkan untuk pewarnaan yang terbaik menggunakan pewarnaan Eosin *yellow* dan *Methylene blue* dengan perbandingan 2:1.

Kata kunci: Kromatin, spermatozoa, LMP-*agarose*, *lysis solution*, pewarnaan.

Pendahuluan

Keberhasilan program Inseminasi Buatan (IB) ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya faktor sumber daya manusia (SDM) yaitu inseminator, peternak, faktor betina dan faktor pejantan, dalam hal ini adalah kualitas semen yang diinseminasikan. Semen beku berdasarkan Badan Standardisasi Nasional (BSN) dengan no SNI 4869.1:2008 mengenai semen beku sapi, *post thawing* harus menunjukkan spermatozoa hidup dan bergerak maju (motil spermatozoa) minimal empat puluh persen dan skor gerakan spermatozoa minimal dua. Morrell and Rodriguez-Martinez (2009) menyatakan sub populasi spermatozoa yang dapat memfertilisasi ovum adalah spermatozoa yang motil, *viable* dengan morfologi yang normal serta mempunyai kromatin yang *intact*.

Penyebab kerusakan kromatin DNA menurut Rodriguez-Martinez (2007) dapat terjadi karena perubahan polimer DNA dan secara terus menerus terpapar pada lingkungan fisik dan kimia yang bervariasi yang berpotensi mengubah struktur alamiah DNA tersebut. Perubahan ini akan memengaruhi proses replikasi (Oliva, 2006) dan transkripsi DNA yang mengarah pada kerusakan DNA (Evenson *et al.*, 2002). Kerusakan kromatin DNA spermatozoa semakin diakui sebagai faktor penting penyebab terjadinya infertilitas. Beberapa kasus menunjukkan terdapat korelasi antara kerusakan kromatin DNA spermatozoa dengan fertilitas (Evenson and Wixon 2006), penurunan integritas membran plasma (Nishizono *et al.*, 2004), kesalahan kondensasi kromatin, dan peningkatan fragmentasi DNA (Yildiz *et al.*, 2007). Priyanto *et al.* (2015) membandingkan pengujian DNA spermatozoa menggunakan *cytochemical assay* dengan pewarnaan *toluidine blue* dan Kit *halomax*, hasilnya menunjukkan Kit *halomax* lebih sensitif untuk menguji kerusakan spermatozoa setelah pembekuan dengan melihat dispersi kromatin yang terjadi.

Kit *halomax* merupakan produk komersial dan harus diimpor sehingga harganya mahal dan tidak efisien karena satu jenis kit hanya digunakan untuk menguji kerusakan kromatin DNA pada satu jenis ternak saja, selain itu penggunaan Kit *halomax* berdasarkan prosedurnya diamati menggunakan mikroskop *fluorescent* yang sulit ditemui di Balai Inseminasi Buatan (BIB). Pengujian kromatin DNA spermatozoa ini bertujuan untuk mengembangkan metode pengujian dispersi kromatin DNA buatan sendiri dengan prinsip kerja yang sama dengan Kit *halomax* tetapi dapat digunakan pada spermatozoa ternak dengan morfometri spermatozoa yang hampir sama seperti domba, kambing dan sapi.

Materi dan Metode

Menentukan konsentrasi *Low Melting Point-agarose* (LMP-*agarose*) terbaik

a. Pembuatan LMP-*agarose*

Konsentrasi LMP-*agarose* yang digunakan pada penelitian ini ada tiga jenis yaitu 0,6%; 0,7% dan 0,8%. LMP-*agarose* yang telah dibuat disimpan dalam suhu 5°C. Semen segar dari sapi, domba dan kambing yang digunakan untuk menguji LMP-*agarose* ini dikoleksi kemudian dievaluasi secara makro dan mikroskopis setelah itu diencerkan dengan *Phosphate Buffer Saline* hingga 20 juta sel/ml

b. Pengujian Kerapatan LMP-*agarose*

Semen segar (sapi, kambing dan domba) yang sudah diencerkan ditetaskan ke dalam LMP-*Agarose* yang sebelumnya telah dilelehkan. Sebanyak 20µL campuran LMP-*agarose* dengan semen ditetaskan ke dalam sumuran pada *object glass* khusus dan ditutup dengan *cover glass*. *Object glass* diinkubasi dalam lemari es (4°C). *Cover glass* diambil, selanjutnya *object glass* dievaluasi di bawah mikroskop binokuler (Olympus CX21). Spermatozoa pada masing-masing konsentrasi dihitung dari sepuluh lapangan pandang.

Pengujian jenis *lysis solution* (LS) untuk melisis membran spermatozoa

a. Persiapan *lysis solution*

Jenis LS yang digunakan adalah LS I (0,4M Tris, 0,8M DTT, 1% SDS, pH 7,5), LS II (0,4M Tris, 2M NaCl, 1% SDS, pH 7,5), dan LS III (0,4M Tris-HCl, 2M NaCl, 1% SDS, 0,05M EDTA, pH 7,5). Seluruh LS yang telah dibuat disimpan pada tabung, dan disimpan pada suhu 5°C.

b. Sampel semen untuk pengujian LS.

Struktur sel pada spermatozoa sapi, kambing dan domba sama sehingga pengujian jenis *lysis solution* (LS) digunakan hanya satu jenis spermatozoa ternak yaitu spermatozoa sapi. Sampel semen yang digunakan adalah semen beku sapi dari BIB Lembang. Semen beku disimpan pada kontainer (-196°C). Sebelum pengujian semen beku *dithawing* pada suhu 37°C selama 30 detik. Selanjutnya semen beku sapi diencerkan menggunakan *Phosphate Buffered Saline* (PBS), dengan konsentrasi akhir 15-20 juta sel/mL.

c. Pengujian LS pada semen beku

Sebanyak 50 µL semen yang sudah diencerkan, dimasukkan ke dalam tabung yang berisi LMP-*agarose* (pada tahap I) yang telah dilelehkan lalu dihomogenkan. Campuran tersebut selanjutnya diteteskan dalam tiga buah *object glass*, ditutup dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 5 menit. *Cover glass* diangkat, setelah itu dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop binokuler.

Setiap *object glass* diteteskan dengan jenis LS yang berbeda masing-masing LS I, LS II dan LS III. Seluruh *object glass* didiamkan selama 5 menit. Setelah itu direndam dalam *aquadest* 5 menit, dilanjutkan direndam dalam etanol 70%, 90%, 100% (masing-masing 4 menit), kemudian dikeringkan. Setelah itu preparat direndam dalam *aquadest* selama 5 menit, dikeringanginkan, direndam dalam *eosin yellow* (Eosin Y) 1% selama 5 menit, direndam

dalam *aquadest* selama 5 menit, dilanjutkan dengan direndam dalam *methylen blue* selama 5 menit dan terakhir direndam dalam *aquadest* selama 5 menit. Preparat diangkat dan dikeringanginkan, selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 400X.

Pengujian jenis pewarnaan

a. Persiapan pewarna.

Jenis pewarnaan yang digunakan pada penelitian ini adalah; a) Pewarnaan bertahap Eosin Y dengan *Methylene blue* 1:1, b) Pewarnaan campuran Eosin Y dengan *Methylene blue* 1:1, c) Pewarnaan bertahap Eosin Y dengan *Methylene blue* 2:1.

b. Sampel semen

Semen yang digunakan adalah semen beku sapi, domba dan kambing dari BIB Lembang. Prosedur *thawing* dan pengenceran semen sama dengan yang digunakan pada tahap II, kemudian dimasukkan dalam LMP-*agarose* terbaik tahap I, dan dimasukkan pada LS terbaik tahap II.

c. Pengujian pewarna

Semen diwarnai dengan tiga macam pewarnaan berbeda sesuai metode tahap II. Preparat diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 400X menggunakan *green filter*.

Hasil dan Pembahasan

Konsentrasi LMP-*agarose* terbaik untuk menjebak spermatozoa ternak

LMP-*agarose* merupakan polisakarida turunan yang digunakan untuk memisahkan DNA berukuran lebih dari 100 bp, sedangkan untuk memisahkan DNA dengan ukuran lebih pendek dapat digunakan gel poliakrilamid (Surzycky 2000). Bartlett and Stirling (2003) menyatakan semakin tinggi konsentrasi *agarose*, semakin kaku gel yang dibuat dan pori-pori yang terbentuk semakin rapat sehingga sukar untuk

dilewati molekul-molekul DNA. Pada penelitian ini terbukti semakin tinggi konsentrasi spermatozoa maka semakin banyak spermatozoa yang terjebak.

Pada spermatozoa sapi diketahui konsentrasi 0,8% LMP-*agarose* merupakan konsentrasi terbanyak untuk menjebak spermatozoa dengan jumlah $30,69 \pm 1,28$ sel, pada kambing dan domba konsentrasi LMP-*agarose* yang sama spermatozoa terjebak juga paling banyak yaitu $28,29 \pm 0,81$ dan $26,58 \pm 1,47$ sel (Tabel 1).

Tabel 1 Jumlah spermatozoa yang terjebak di dalam LMP-*agarose* (rata-rata \pm SD)

Jenis Ternak	Konsentrasi	Spermatozoa
Sapi	0,6%	20,100 \pm 0,562
	0,7%	24,310 \pm 1,272
	0,8%	30,690 \pm 1,278
Kambing	0,6%	14,950 \pm 0,712
	0,7%	21,770 \pm 1,479
	0,8%	28,290 \pm 0,810
Domba	0,6%	15,795 \pm 1,148
	0,7%	20,545 \pm 1,179
	0,8%	26,585 \pm 1,468

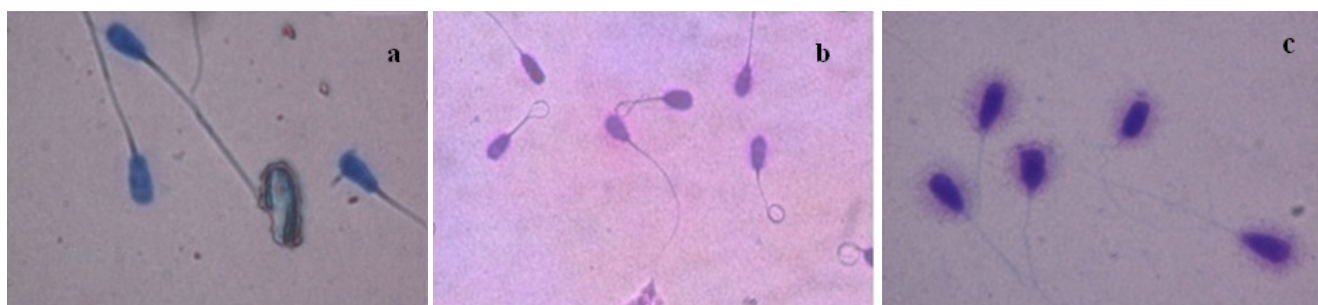
Merujuk kepada Cerolini *et al.* (2001) jumlah spermatozoa dalam satu lapang pandang agar mudah diamati adalah 10-15 sel spermatozoa. Berdasarkan hal tersebut pada penelitian ini konsentrasi LMP-

agarose yang paling baik untuk menjebak spermatozoa adalah 0,6% pada spermatozoa kambing dan domba. Pada spermatozoa sapi, jumlah spermatozoa yang terjebak pada LMP-*agarose* konsentrasi 0,6% masih melebihi batas lapang pandang terbaik, sehingga disarankan konsentrasi *agarose* dapat diturunkan untuk memudahkan pengamatan.

Morfometri spermatozoa sapi lebih besar dibandingkan dengan sapi dan domba. Panjang kepala spermatozoa sapi 0,6 μ m lebih panjang dan sekitar 0,20 μ m lebih lebar dari spermatozoa kambing dan domba. Oleh karena itu, pada konsentrasi LMP-*agarose* 0,6% jumlah spermatozoa sapi akan lebih banyak terjebak dibandingkan kedua ternak lainnya.

Lysis Solution (LS) terbaik untuk melisiskan membran spermatozoa ternak

Menurut Holme and Hazel (1998) tahap pertama dalam isolasi DNA adalah proses perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Metode yang dapat digunakan untuk isolasi plasmid antara lain yaitu *boiling lysis*, *lysis with detergent*, *mechanical lysis*, *alkaline lysis*, dan *enzimatic digestion*. Hasil penelitian pada tahap kedua dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1(a) Spermatozoa dengan LS I; (b) Spermatozoa dengan LS II; (c) Spermatozoa dengan LS III

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa LS III dapat digunakan pada ketiga ternak tersebut (Gambar 1). Hal ini karena ketiga komposisi membran sel dari ketiga spermatozoa ternak tersebut hampir sama, yaitu terdiri dari 43% lipid, 48% protein, 9% karbohidrat dan zat-zat lain yang bergabung bersama secara non kovalen.

Formulasi LS III yaitu 0,4M Tris-HCl, 2M NaCl, 1% SDS 0,05M EDTA merupakan LS terbaik, hal tersebut dapat dilihat dari Gambar 1.c kromatin DNA spermatozoa pada LS III terlihat lebih jelas bila dibandingkan dengan kedua LS I dan LS II.



Gambar 2. a) Perbandingan konsentrasi *methylene blue* dan eosin Y 1:1; b) Perbandingan konsentrasi *methylene blue* dan eosin Y 1:1(dicampur); c) Perbandingan konsentrasi *methylene blue* dan eosin Y 1:2

Chelating agent pada *ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) diduga menyebabkan kromatin DNA yang keluar dapat terlihat dengan baik. Menurut Muladno (2002), dalam proses isolasi DNA menggunakan LS yang mengandung EDTA berfungsi merusak membran sel secara kimiawi dengan cara mengikat ion magnesium selain itu berfungsi mempertahankan integritas sel maupun aktifitas enzim nuclease yang merusak asam nukleat. Lebih lanjut Corkill and Rapley (2008) menyatakan EDTA berperan untuk menginaktivasi enzim *DNase* yang dapat mendenaturasi DNA yang diisolasi, EDTA juga dapat menginaktivasi enzim nuklease dengan cara mengikat ion magnesium dan kalsium yang dibutuhkan sebagai kofaktor enzim *DNase* sehingga membran plasma menjadi tidak stabil.

Jenis pewarnaan terbaik untuk mewarnai kromatin DNA

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pewarnaan eosin Y *methylene blue* 1:2 memberi hasil yang lebih baik (kromatin DNA mudah diamati) bila dibandingkan dengan kedua konsentrasi. Hal tersebut terlihat jelas pada Gambar 2.c bahwa kromatin dan membran sel spermatozoa dapat lebih terlihat bila dibandingkan dengan ke dua pewarna lainnya. Menurut Benson and Brown (2004), untuk mewarnai, *eosin yellow* (Eosin Y) secara khas digunakan dalam konsentrasi 1 sampai 5 % berat berdasarkan volume, yang dilarutkan dalam air atau etanol sedangkan untuk *methylene blue* konsentrasi yang digunakan ialah 0,5% sampai 1%.

Menurut Harley and Prescott (2002) *methylene blue* (MB) dan Eosin merupakan zat warna yang sering digunakan dalam pewarnaan sederhana, dimana MB dapat bekerja dengan baik pada membran sel karena bersifat basa alkalin (komponen kromofiknya bermuatan positif), sedangkan sitoplasma sel spermatozoa bersifat basofilik (suka terhadap basa) sehingga terjadilah gaya tarik antara komponen kromofor pada pewarna dengan sel spermatozoa. Hal tersebut menyebabkan sel spermatozoa dapat menyerap pewarna dengan sel spermatozoa. Eosin digunakan pada pewarnaan negatif yang merupakan pewarna asam dan memiliki komponen kromofik yang bermuatan negatif, yang juga dimiliki oleh sitoplasma spermatozoa. Pewarna tidak dapat menembus atau terpenetrasi ke dalam sel spermatozoa karena *negative charge* pada permukaan sel spermatozoa.

Pada penelitian ini diperoleh hasil untuk identifikasi kerusakan kromatin DNA pada domba dan kambing dapat menggunakan konsentrasi LMP-*agarose* 0.6%, menggunakan LS III dan pewarna Eosin Y *Methylene blue* 2:1. Pada ternak sapi disarankan agar dilakuan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan konsentrasi LMP-*agarose* yang lebih tepat.

Kesimpulan

Pengembangan metode identifikasi kerusakan DNA spermatozoa ternak domba dan kambing dapat dibuat menggunakan konsentrasi LMP-*agarose*

0,6%, sedangkan pada spermatozoa sapi ketiga konsentrasi tersebut tidak dapat digunakan untuk menjebak spermatozoa sapi. *Lysis solution* (LS) III (0,4M Tris-HCl, 2M NaCl, 1% SDS 0,05M EDTA, pH 7,5) merupakan LS terbaik bila dibandingkan kedua LS yang lainnya dan jenis pewarnaan terbaik menggunakan perbandingan pewarnaan Eosin *Yellow Methylene blue* 2:1.

Daftar Pustaka

- Bartlett, J., Stirling, D. 2003. *PCR Protocols Second Edition*. New Jersey: Humana Press.
- Benson, H. J., Brown, A.E. 2004. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology: Complete Version. ninth Edition*. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T.M. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of Boar semen. *J Reprod.* 121:395-401.
- Corkill, G., Rapley, R. 2008. *The Manipulation of Nucleic Acids: Basic Tools and Techniques in Molecular Biomethods Handbook Second Edition*. Ed: Walker, J.M. Rapley, R. Humana Press. NJ.USA.
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm dna fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 23 (1): 25-43.
- Evenson, D.P., Wixon, R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology.* 65:979-991.
- Harley, J.P., Prescott, L.M. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.
- Holme, D.J., Hazel, P. 1998. *Analytical Biochemistry Third Edition*. London: Addison Wesley Longman.
- Morrell, J.M. and H. Rodriguez-Martinez. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open J Androl.* 1 (1): 1-9.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pusataka Wirausaha Muda. Bogor.
- 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. *Bio of Reprod.* 71: 973-978.
- Oliva, R. 2006. Protamine and male infertility. *J Hum Reprod.* 12: 417-435.
- Priyanto, L., Arifiantini, R.I., Yusuf, T.L. 2015. Deteksi kerusakan DNA spermatozoa semen segar dan semen beku sapi menggunakan pewarnaan toluidine blue. *J Vet.* 16: 48-55.
- Rodríguez-Martinez, H. 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev.* 19 (1):91-101.
- Surzycky, R. 2000. *Molecular and Cellular Biology*. Wadsworth Inc., Belmont.
- Yildiz, C., Ottaviani, P., Law, N., Ayearst, R. Liu, L., McKerlie, C. 2007. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Bio of Reprod.* 133: 585-595.