

## DETEKSI KERUSAKAN DNA SPERMATOZOA SAPI PASCA PEMBEKUAN DENGAN PEWARNA ACRIDINE ORANGE

**Annisa Rahmawati**

Program studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas PGRI Ronggolawe Tuban

Emai: [Anisasigit@gmail.com](mailto:Anisasigit@gmail.com)

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kerusakan DNA spermatozoa sapi pasca pembekuan semen dengan menggunakan pewarna *acridine orange*. Sampel yang digunakan berasal dari Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Malang. Sampel tersebut terdiri dari semen segar, semen dengan lama waktu pembekuan 1 minggu, 1 bulan, 1 tahun, 3 tahun, dan 6 tahun. Data penelitian meliputi penghitungan persentase kerusakan DNA spermatozoa dilakukan menggunakan teknik pewarnaan *acridine orange* dan diamati menggunakan mikroskop *fluorescence*. Data dianalisis menggunakan uji homogenitas dilanjutkan uji normalitas kemudian ANOVA satu arah dengan derajat signifikansi 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kerusakan DNA spermatozoa berturut-turut sebesar 1,1; 1,9; 2,2; 1,9; 2,2; 2,0%. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa proses dan lama waktu pembekuan semen tidak merusak DNA spermatozoa.

**Kata kunci:** kerusakan DNA, pembekuan, pewarnaan *acridine orange*

### Pendahuluan

Inseminasi buatan (IB) adalah salah satu bioteknologi dalam bidang reproduksi ternak yang memungkinkan manusia mengawinkan ternak betina yang dimiliki tanpa perlu seekor pejantan. Keberhasilan pelaksanaan IB sangat ditentukan oleh beberapa faktor yaitu kesuburan betina inseminator, ketepatan waktu inseminasi dan yang terpenting adalah kualitas semen yang digunakan. Inseminasi buatan (IB) memberikan kemudahan yang ekonomis untuk meningkatkan produktivitas secara luas (Siddieqy, 2004). Dengan adanya teknologi IB secara langsung dapat memperbaiki mutu genetik ternak sapi khususnya sapi Friesian Holstein yang sekarang ini banyak dikembangkan di Indonesia. Inseminasi buatan (IB) dapat dilakukan dengan menggunakan semen segar maupun semen yang telah dibekukan, namun dalam kenyataannya bahwa IB banyak menggunakan semen beku. Hal ini dilakukan karena dirasa lebih efisien dalam distribusi.

Pengertian semen beku adalah semen yang berasal dari pejantan unggul yang sehat, bebas dari penyakit hewan menular yang diencerkan sesuai prosedur proses produksi semen beku dan disimpan di dalam rendaman nitrogen cair pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  dalam kontainer kriogenik (Departemen Jendral Peternakan, 2007). Proses pembekuan merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan ataupun materi genetik (termasuk semen dan oosit) dalam keadaan beku. Pada teknik ini terjadi penurunan aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-

organel di dalam sel, sehingga fungsi fisiologi, biologi, dan morfologi tetap terjaga. Aplikasi pembekuan sel untuk dunia peternakan, terutama pada pembekuan semen telah dipakai di banyak negara. Di Indonesia alih teknologi ini berperan dalam meningkatkan kapasitas produksi ternak sapi dan kambing. Hewan dari spesies yang berbeda pun dapat menggunakan aplikasi ini.

Pada umumnya masalah pembekuan semen berkisar pada dua fenomena yaitu pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air, yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es. Pembekuan merupakan suatu fenomena pengeringan fisik. Pada pembekuan semen dimana terbentuk kristal-kristal es, terjadi penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel. Kristal sel intraseluler dapat merusak sperma secara mekanik. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan lipoprotein di membran sel spermatozoa dan pada waktu *thawing*, permeabilitas membran sel akan berubah dan dapat menyebabkan kematian sel (Toelihere, 1993). Sebelum semen beku digunakan inseminasi buatan, terlebih dahulu perlu dilakukan pengujian terhadap kualitas semen beku. Yang paling umum di uji adalah dengan menghitung motilitas, viabilitas dan morfologi *post thawing*. Selama ini pemeriksaan kualitas spermatozoa sering kali hanya dilakukan sampai *post thawing* saja, tidak melihat apakah terjadi kerusakan DNA selama semen dibekukan. Karena kualitas spermatozoa sapi berhubungan dengan

kondisi DNA. Kerusakan DNA pada spermatozoa dapat berakibat fatal karena dapat mengakibatkan penurunan kualitas spermatozoa. Padahal kualitas spermatozoa merupakan kunci utama dalam proses pembekuan. Kualitas spermatozoa terdiri dari kualitas makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis meliputi warna, bau, konsistensi, volume dan pH. Sedangkan mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas, dan morfologi. Motilitas dengan nilai  $\geq 40\%$  dapat langsung digunakan atau dikirimkan ke lapangan untuk pelaksanaan inseminasi. Semakin tinggi persentase viabilitas spermatozoa maka dapat meningkatkan fertilitasi (Madyawati, 2007), sedangkan morfologi spermatozoa berhubungan dengan abnormalitas. Spermatozoa abnormal melewati 30-35% menunjukkan adanya infertilitas atau ketidaksuahan sehingga tidak dapat digunakan untuk IB, sedangkan menurut Peris *et al.* (2004) menemukan bahwa pembekuan dapat menyebabkan kerusakan DNA inti. Menurut Hendra (2009) terjadi kerusakan DNA pada spermatozoa manusia yang telah dibekukan. Kerusakan DNA pada spermatozoa dapat dideteksi melalui metode histokimia, yaitu dengan teknik pewarnaan *acridine orange* (AO). Pewarnaan AO merupakan teknik pewarnaan yang digunakan untuk mendeteksi DNA maupun RNA. Dalam penelitian ini metode AO digunakan untuk mendeteksi kerusakan DNA pada spermatozoa yang telah dibekukan. Berdasarkan uraian diatas menjadi sangat penting dilakukan kajian tentang kerusakan DNA spermatozoa sapi karena sebagai salah satu faktor penentu kualitas spermatozoa yang baik.

**Metode penelitian**

**Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan bulan Agustus sampai Desember 2012 di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang. Pemeriksaan pewarnaan kerusakan DNA spermatozoa sapi dilakukan di *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga.

**Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spermatozoa yang sudah dibekukan (dalam bentuk *ministaw*) selama 1 minggu, 1 bulan, 1 tahun, 3 tahun, dan 6 tahun. Sampel penelitian (semen yang segar /tanpa proses pembekuan dan semen yang telah dibekukan selama 1 minggu, 1 bulan 1 tahun, 3 tahun, dan 6 tahun diperoleh dari BBIB; asam sitrat; 0,2 *dibasic sodium phosphat*; NaCl fisiologis, *acridine orange* dan nitrogen cair.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi vagina sapi buatan, pipet, gelas obyek, gelas penutup, *waterbath*, tabung reaksi, rak tabung, erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, api bunsen, mikroskop cahaya (Olympus), mikroskop *fluorescence* (Olympus).

**Pewarnaan *Acridine Orange* (AO)**

Sampel dibuat apusan dan dibiarkan kering udara. Setiap apusan dibiarkan semalam dalam larutan Carnoy, kemudian disiapkan dengan metanol dan asam asetat glasial dalam proporsi 3:1. Slide dibiarkan kering udara lagi, dan diinkubasi dalam larutan tampon (80 mmol / L asam sitrat dan 15 mmol / L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 2,5) pada 75 ° C selama 5 menit untuk menguji stabilitas kromatin. Selanjutnya, slide diwarnai dengan *acridine orange* (0,2 mg / mL). Slide dicuci dengan air untuk menghilangkan warna latar belakang; saat masih basah, slide ditutupi dengan coverslips dan diamati dengan mikroskop *fluorescence*. Seratus sel dianalisis di setiap slide pengamatan. Spermatozoa dengan konten DNA normal menyajikan fluoresensi hijau, sedangkan spermatozoa dengan kerusakan DNA memancarkan fluoresensi dalam spektrum yang bervariasi dari kuning- merah. Persentase spermatozoa dengan kromatin utuh dihitung dengan membagi jumlah hijau bernoda spermatozoa dengan jumlah total spermatozoa dan mengalikan hasilnya dengan 100. Perhitungan persentase kerusakan DNA spermatozoa sapi:

$$\frac{\text{Spermatozoa dengan warna kuning (rusak)} \times 100\%}{\text{Total spermatozoa yang diamati}}$$

**Analisis data**

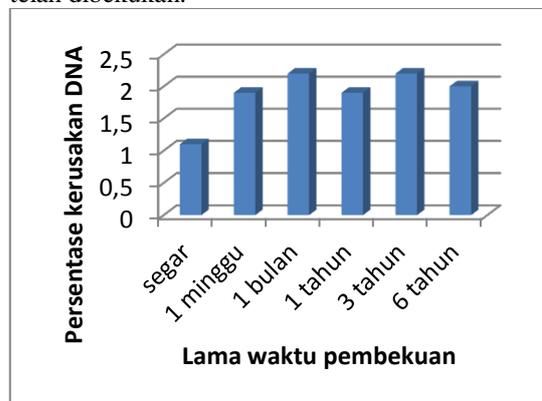
Pada penelitian ini, data kerusakan DNA spermatozoa dianalisis statistika dengan menggunakan uji homogenitas dilanjutkan uji normalitas kemudian ANOVA satu arah dengan derajat signifikansi 5%. Beda antar mean perlakuan menggunakan uji Duncan.

**Hasil penelitian**

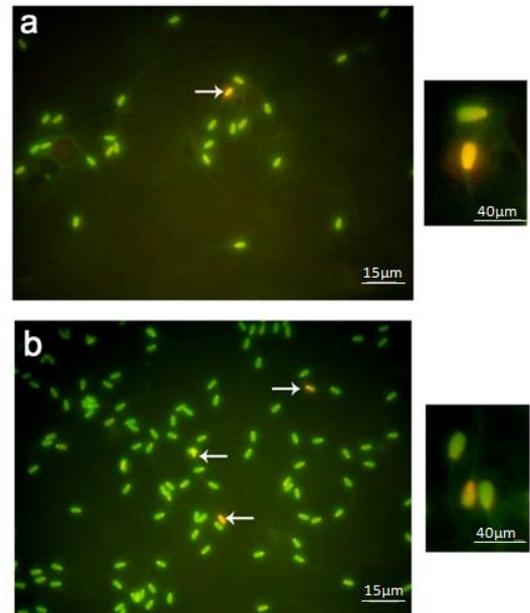
Data kerusakan DNA spermatozoa sapi Friesian Holstein yang diperoleh dianalisis menggunakan uji statistik. Uji awal yang dilakukan adalah uji kenormalan dan homogenitas data dengan menggunakan uji Skewness atau Kurtosis dan uji Levene Test. Nilai Rasio Skewness (Skewness/Stadart Error of Skewness) untuk keenam perlakuan: Segar = 1,30; 1 minggu

= 0,99; 1 bulan = -0,03; 1 tahun = - 1,32; 3 tahun = 0,69; 6 tahun = 0. Nilai Rasio Kurtosis (Kurtosis/Stadart Error of Kurtosis) untuk keenam perlakuan: Segar = 1,22 ; 1 minggu = 0,47 ; 1 bulan = 0,11 ; 1 tahun = 1,12 ; 3 tahun = 0,61 ; 6 tahun = 0,6. Pedoman : Jika Rasio Skewness atau Kurtosis antara -2 sampai dengan +2 maka dapat disimpulkan distribusi normal, sehingga perhitungan variabel kerusakan DNA untuk keenam perlakuan mempunyai distribusi normal. Dari uji Levene Test didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,064, nilai tersebut lebih besar dari  $\alpha = 0,05$  yang menunjukkan bahwa data kerusakan DNA homogen. Uji Skewness atau Kurtosis dan uji Levene Test menunjukkan bahwa data normal homogen sehingga dapat dilanjutkan ke uji ANOVA satu arah untuk mengetahui perbedaan kerusakan DNA akibat perlakuan lama waktu pembekuan. Tahap selanjutnya yaitu melakukan uji ANOVA satu arah. Dari uji ANOVA satu arah didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,223. Nilai tersebut lebih besar dari  $\alpha = 0,05$  yang artinya H0 diterima, yakni tidak ada pengaruh lama waktu pembekuan terhadap kerusakan DNA spermatozoa sapi Friesian Holstein.

Dari hasil penelitian diperoleh persentase kerusakan DNA spermatozoa sapi Friesian Holstein antara 1,1 – 2,2 % dengan rerata tertinggi pada perlakuan 1 bulan dan 3 tahun yaitu sebesar 2,2 % dan rerata terendah pada perlakuan segar yaitu sebesar 1,1 %. Rerata kerusakan DNA spermatozoa semua perlakuan (1 minggu, 1 bulan, 1 tahun, 3 tahun, dan 6 tahun) tidak berbeda signifikan dengan segar. Tidak dilakukan uji lanjutan Duncan guna melihat beda antar perlakuan. Karena persentase kerusakan DNA spermatozoa segar hampir sama dengan persentase kerusakan DNA spermatozoa yang telah dibekukan.



Gambar 1. Persentase kerusakan DNA spermatozoa sapi Friesian Holstein dengan variasi lama waktu pembekuan semen.



Gambar 2. Pewarnaan dengan menggunakan *acridine orange*.

a. Semen segar, b. Semen yang telah dibekukan. DNA spermatozoa rusak berwarna kuning-oranye (tanda panah), DNA Spermatozoa normal berwarna hijau. Menggunakan mikroskop *flourescence*.

### Pembahasan

Pada spermatozoa, DNA sebagai pembawa materi genetik selain terdapat di bagian inti juga terdapat di mitokondria. Senyawa DNA inti yang terdapat di bagian kepala spermatozoa sangat menentukan untuk berlangsungnya fertilisasi. Integritas DNA inti merupakan faktor utama untuk proses fertilisasi. Hal ini disebabkan kondensasi DNA inti yang berada dikepala spermatozoa sangat tinggi sehingga meningkatkan interaksi DNA-protamin. Keadaan ini sangat peka terhadap faktor mikro-lingkungan, seperti peningkatan suhu lingkungan, interaksi mikroba, stress oksidasi yang berakibat terjadinya fragmentasi DNA. Fragmentasi DNA pada inti berkorelasi dengan penurunan kualitas yang nantinya menurunnya fertilisasi.

Pergeseran *metachromatic* digunakan dalam tes integritas DNA untuk kuantifikasi Kerusakan DNA dengan uji AO. Selama perlakuan diberikan asam ringan untuk mendeteksi kerusakan DNA. *Acridine orange* mengikat *double-stranded* DNA menghasilkan fluoresensi hijau sementara pengikatan *acridine oranye* untuk *single-stranded* DNA menghasilkan fluoresensi orange ke merah ( Ichimura *et al.*, 1971; Peacocke, 1973). Flouresensi hijau

menandakan bahwa spermatozoa tidak terdenaturasi dengan perlakuan asam, sedangkan fluoresensi orange ke merah menandakan bahwa spermatozoa terdenaturasi dengan perlakuan asam. Teknik ini menggunakan mikroskop *fluorescence* dan cepat, sederhana dan murah.

Data-data hasil pengamatan dan hasil analisis statistik semuanya menunjukkan tidak adanya beda signifikan artinya bahwa tidak ada pengaruh lama waktu pembekuan terhadap kerusakan DNA spermatozoa sapi Friesian Holstein. Hal ini disebabkan karena DNA spermatozoa lebih toleran terhadap proses pembekuan. Sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Chanalpiwat (2010) yang menyatakan bahwa setelah dilakukan pembekuan terjadi penurunan pada beberapa parameter kualitas spermatozoa namun tidak pada kerusakan DNA. Faktor genetik lebih banyak berperan dibandingkan lama waktu pembekuan. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan kerusakan DNA : (1) faktor internal, hal ini ditentukan secara genetik sejak lahir rentan terhadap paparan eksternal yang akibatnya cenderung mengalami kerusakan DNA. (2) faktor eksternal yang diduga berperan pada terjadinya kerusakan DNA adalah adanya kerusakan oksidatif yang berupa adanya infeksi atau paparan bahan-bahan oksidatif lainnya. Radikal bebas yang dihasilkan dari proses infeksi dan bahan oksidan lain tersebut yang akan menimbulkan kerusakan pada membran sel.

Kualitas spermatozoa dikatakan kurang baik jika terjadi mutasi, delesi dan adanya haplogrup DNA mitokondria spesifik. Ada dua faktor yang melindungi DNA spermatozoa dari pengaruh oksidasi, yaitu strukturnya yang sangat kompak dan adanya antioksidan pada plasma semen (Twigg *et al.*, 1998).

### Kesimpulan

Proses dan lama waktu pembekuan semen tidak merusak DNA spermatozoa sapi Friesian Holstein.

### Daftar pustaka

Chanalpiwat, P, Kampon, K, Padet, T. 2010. The sperm DNA damage after cryopreservation of boar semen in relation to post-thawed semen qualities, antioxidant supplementation and boars effects. *J. Vet. Med.*40(2)187-193

Departemen Jendral Peternakan.2007.Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian. Jakarta.5-13

Hendra. 2009. Deteksi Kerusakan DNA Spermatozoa dengan Metode Comet Assay pada Oligospermia Idiopatik. *Tesis*. Universitas Airlangga.

Ichimura, S., M. Zama and H.Fujita. 1971. Quantitative determination of single-stranded section in DNA using the fluorescent probe acridine orange. *Biochim Biophys Acta*. 240: 485-95.

Madyawati, S.P. 2007. Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi *Frisian Holstein* Terhadap Kualitas Semen Beku. Desertasi. Universitas Airlangga.Surabaya.50.

Madyawati, S.P. 2007. Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi *Frisian Holstein* Terhadap Kualitas Semen Beku. Desertasi. Universitas Airlangga.Surabaya.50.

Situmorang,P. 2004. Prospek Penggunaan Semen Dingin (Chilled Semen) dalam Usaha meningkatkan Produksi Sapi Perah. <http://www.balitnak.litbag.deptan.go.id/mod.php> (16 mei 2012)

Shiddieqy, M.I. 2004. Teknologi Pengawetan "Spermatozoa" Ternak. <http://www.pikiran-rakyat.com>. [12 Juni 2012]

Toelihere, M.R. 1979. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung.

Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung.

Twigg, J, Irvine, D.S, Houston, P, Fulton, N, Michael, L, and Aitken, R.J. 1998. Latrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation : protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 4:439-445.