

Status DNA Spermatozoa Domba Setelah Proses Pengeringkakuan

TAKDIR SAILI¹, WAHONO ESTHI PRASETYANINGTYAS², MOHAMAD AGUS SETIADI³, SRIHADI AGUNGPRİYONO² dan ARIEF BOEDIONO²

¹Laboratorium Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232. Email: takdir69@yahoo.com

²Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

³Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

(Diterima dewan redaksi 8 Mei 2006)

ABSTRACT

SAILI, T., W.E. PRASETYANINGTYAS, M.A. SETIADI, S. AGUNGPRİYONO and A. BOEDIONO. 2006. Status of ram spermatozoa DNA after freeze-drying process. *JITV* 11(3): 215-221.

The process of freeze drying caused detrimental effect on plasma membrane and acrosome of the spermatozoa, even it potentially could alter the chromatin and DNA integrities. On the other hand, DNA integrity is essential for spermatozoa to participate in pronucleus formation during fertilization event. Therefore the evaluation of DNA integrity should be carried out to study the effect of freeze drying process. EDTA, EGTA, and PBS were used as dilution media of spermatozoa prior to freeze drying process to protect the DNA. Toluidine blue staining and comet assay methods were used to evaluate the alteration on chromatin and DNA integrities of spermatozoa, respectively. The results revealed that the highest compacted chromatin after 6 months storage of freeze-dried spermatozoa were observed from EGTA-3 (98%) and EGTA-1 (97%) treatments that had significant differences compared to all PBS treatments (90-92%), but not for fresh spermatozoa (100%). Whereas, the highest compacted DNA integrity of freeze-dried spermatozoa were observed from EGTA-2 (92%) and EGTA-3 (92%) but had no significant differences compared to other treatments including fresh spermatozoa (97%). These results demonstrate that EDTA and EGTA tend to be able to protect chromatin and DNA integrities of ram spermatozoa during freeze-drying and storage compared to PBS.

Key Words: Freeze-Drying, Spermatozoa, DNA, Toluidine Blue, Comet Assay

ABSTRAK

SAILI, T., W.E. PRASETYANINGTYAS, M.A. SETIADI, S. AGUNGPRİYONO dan A. BOEDIONO. 2006. Status DNA spermatozoa domba setelah proses pengeringkakuan. *JITV* 11(3): 215-221.

Proses pengeringkakuan menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan akrosom spermatozoa bahkan berpotensi dapat mengubah integritas kromatin dan DNA spermatozoa. Pada sisi lain, integritas DNA sangat penting bagi spermatozoa untuk berperan dalam proses pembentukan pronukleus pada peristiwa fertilisasi. Oleh karena itu, evaluasi tentang integritas DNA spermatozoa harus dilakukan untuk melihat pengaruh proses pengeringkakuan. Media EDTA, EGTA dan PBS digunakan sebagai pelarut spermatozoa sebelum proses pengeringkakuan. Metode pewarnaan *toluidine blue* dan *comet assay*, masing-masing digunakan untuk mengevaluasi perubahan integritas kromatin dan DNA spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase tertinggi integritas kromatin spermatozoa domba hasil pengeringkakuan yang disimpan selama 6 bulan pada lemari es diperoleh pada perlakuan EGTA-3 (98%) dan EGTA-1 (97%) yang berbeda nyata lebih tinggi dengan semua perlakuan PBS (90-92%) dan EDTA-2 (91%), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan EDTA-1 (93%), EDTA-3 (94%) dan spermatozoa segar (100%). Sementara itu, persentase tertinggi integritas DNA spermatozoa domba hasil pengeringkakuan diperoleh pada perlakuan EGTA-2 (92%) dan EGTA-3 (92%), walaupun tidak berbeda dengan semua perlakuan yang lain (83-90%) termasuk spermatozoa segar (97%). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa EDTA dan EGTA cenderung lebih baik dibandingkan dengan PBS dalam mempertahankan integritas kromatin dan DNA spermatozoa domba selama pengeringkakuan dan penyimpanan.

Kata Kunci: Pengeringkakuan, Spermatozoa, DNA, Toluidine Blue, Comet Assay

PENDAHULUAN

Pengeringkakuan merupakan salah satu metode pengawetan spermatozoa melalui proses pembekuan dan penyubliman yang pada akhirnya akan dihasilkan sediaan spermatozoa dalam kemasan kering. Selama masa penyimpanan, kemasan spermatozoa kering dapat ditempatkan pada lemari es sehingga tidak

membutuhkan suplai nitrogen cair yang terus-menerus seperti penyimpanan spermatozoa dalam kemasan beku. Hal ini akan mempermudah penyimpanan dan pendistribusiannya dari satu tempat ke tempat lain.

Pada proses pengeringkakuan, spermatozoa terlebih dahulu dipapar pada nitrogen cair dengan suhu -196°C untuk mendapatkan sediaan spermatozoa dalam keadaan beku. Selanjutnya dilakukan sublimasi untuk

menguapkan fase air yang telah membeku sehingga pada akhirnya akan didapatkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering. Kedua proses ini dapat mengubah status membran plasma dan akrosom serta morfologi spermatozoa (SAILI *et al.*, 2006) bahkan mungkin dapat mengganggu kestabilan DNA yang terdapat di dalam struktur kromatin spermatozoa tersebut.

Komponen utama inti suatu sel adalah kromatin yang mengandung DNA dan protein pelindung. Kromatin terdiri atas serat-serat yang berwarna terang dengan diameter 15 sampai 20 nm yang membentang dari satu sisi ke sisi lain pada inti sel. Jika suatu sel membelah, maka pilinan serat DNA kromatin akan merapat dan memadat, sehingga menjadi lebih pendek dan tebal. Pada tahap seperti inilah kromatin tersebut berubah menjadi kromosom, yang berasal dari kata *chroma* yang berarti berwarna dan *soma* yang berarti badan (PILIANG dan DOJOSOEBAGIO, 1991).

Kromatin spermatozoa mamalia terdapat pada inti di bagian kepala spermatozoa yang tersusun atas kumpulan DNA dan protein-protein dasar seperti protamin yang kaya asam amino arginina dan sisteina (CURRY dan WATSON, 1995). Protamin berikatan erat dengan gugus fosfat pada tubuh DNA sehingga akan terbentuk struktur yang kokoh pada kromatin. Selain itu, struktur kromatin juga diperkuat oleh ikatan kovalen (disulfida) yang terbentuk dari dua asam amino sisteina pada molekul protamin yang berbeda dan ikatan silang disulfida antara asam amino sisteina dalam satu molekul protamin. Ikatan silang sesama gugus sisteina ini terbentuk selama proses spermatogenesis khususnya pada saat melewati epididimis. Selanjutnya dikatakan bahwa kromatin mempunyai struktur pelindung yang berlapis, walaupun fungsi setiap lapisan tersebut hingga saat ini belum teridentifikasi dengan baik. DNA yang terdapat di dalam struktur kromatin tersebut membentuk koil dan terlindung oleh matriks yang padat sehingga tahan terhadap pengaruh zat kimia seperti enzim DNase I atau pengaruh fisik berupa sonikasi (MOHAR *et al.*, 2002).

Pada kepala spermatozoa terdapat inti yang mengandung DNA yang merupakan komponen vital dalam proses fertilisasi. Semua informasi genetik paternal yang akan diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya terdapat pada untaian DNA di dalam kromosom inti spermatozoa. Oleh karena itu, pemeriksaan terhadap kondisi DNA spermatozoa sangat penting dilakukan. Berbagai metode analisis keutuhan DNA spermatozoa dan sel somatis telah digunakan antara lain *sperm chromatin structure assay* (SCSA) (EVENSON *et al.*, 1980), *acridine orange test* (AO) (TEJADA *et al.*, 1984), *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) *nick-end labelling* (TUNEL)

(GORCYZA *et al.*, 1993a), *in-situ nick translation assay* (NT) (MANICARDI *et al.*, 1995), *toluidine blue test* (TB) (ERENPREISS *et al.*, 2001) dan *comet assay* (FRASER dan STRZEZEK, 2004). Metode pemeriksaan yang menggunakan zat warna seperti AO dan TB merupakan metode pemeriksaan status DNA spermatozoa secara tidak langsung karena hanya memeriksa perubahan struktur kromatin spermatozoa yang berhubungan erat dengan kondisi kestabilan DNA spermatozoa tersebut (ERENPREISA *et al.*, 2003).

Pada penelitian lain dilaporkan bahwa spermatozoa mempunyai kemampuan untuk merusak DNA-nya sendiri karena secara intrinsik mengandung enzim endonuklease. Hal ini dapat dibuktikan dengan pemberian Triton-X yang dikombinasikan dengan $MgCl_2$ mampu mengaktifkan kerja endonuklease sehingga integritas DNA menjadi terganggu. Munculnya beberapa fragmen DNA yang berukuran sama dengan fragmen DNA pada spermatozoa yang diberi perlakuan DNase I merupakan bukti adanya aktivitas endonuklease selama inkubasi. Selanjutnya dikatakan bahwa spermatozoa yang mendapat perlakuan EDTA cenderung dapat mempertahankan integritas DNA-nya dibandingkan tanpa pemberian EDTA (SOTOLONGO *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini digunakan tiga jenis medium pelarut spermatozoa yaitu *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA), *ethylene glycol-bis [beta-aminoethyl ether]-N,N,N', N'-tetraacetic acid* (EGTA) dan *phosphate buffer saline* (PBS). Senyawa EDTA dan EGTA merupakan dua senyawa kimia yang berfungsi sebagai *chelating agent* yang dapat menangkap kation, sedangkan PBS merupakan medium yang umum digunakan sebagai pelarut sel karena mempunyai tekanan osmotik yang isotonik dengan tekanan osmotik sel pada umumnya. Senyawa EDTA dan EGTA dapat mengikat ion metal terutama ion dengan valensi dua, seperti Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , dan Ca^{2+} . Ion-ion tersebut sangat bermanfaat bagi kerja enzim sehingga enzim tidak dapat bekerja dengan baik atau aktivitas enzim berhenti sama sekali jika ion-ion tersebut ditangkap. Senyawa EDTA mempunyai afinitas yang tinggi terhadap ion Mg^{2+} , sedangkan EGTA mempunyai afinitas yang tinggi terhadap ion Ca^{2+} (ANONIM, 2005).

Untuk menganalisis perubahan integritas kromatin dan DNA spermatozoa setelah pengeringbekuan dan penyimpanan selama 6 bulan di dalam lemari es (suhu $3-5^{\circ}C$) berturut-turut digunakan metode pewarnaan *toluidine blue* (ERENPREISS *et al.*, 2001) dan metode *comet assay* (FRASER dan STRZEZEK, 2004). Sebagai pembanding juga dilakukan analisis terhadap status kromatin dan DNA spermatozoa segar.

MATERI DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi, Laboratorium Riset Anatomi, Laboratorium Histologi, dan Laboratorium Pendidikan dan Pelayanan Terpadu serta Unit Rehabilitasi Reproduksi, dan Unit Produksi Bahan Biologis Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor pada bulan Januari sampai dengan bulan Agustus 2005.

Penyiapan spermatozoa

Spermatozoa yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas spermatozoa segar dan spermatozoa hasil pengeringbekuan. Sementara itu, metode pengeringbekuan spermatozoa yang digunakan diadopsi dari KANEKO *et al.*, (2003) dengan sedikit modifikasi. Dalam proses pengeringbekuan digunakan tiga jenis media, yaitu: 1). medium *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) yang mengandung EDTA 50 mM, NaCl 50 mM dan penyangga Tris-HCl 10 mM; 2). medium *ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) yang mengandung EGTA 50 mM, NaCl 50 mM dan penyangga Tris-HCl 10 mM, dan 3). medium *phosphate-buffered saline* (PBS) masing-masing sebagai medium pelarut spermatozoa. Sejumlah 50 µl semen domba dengan konsentrasi 3×10^9 spermatozoa/ml dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml kemudian ditambahkan medium pelarut EDTA, EGTA atau PBS dengan pH 8,0 sebanyak 1,3 ml. Selanjutnya campuran semen tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Fraksi spermatozoa yang berada di bagian atas *tube* diambil secara perlahan-lahan dan dipindahkan masing-masing sebanyak 100 µl ke dalam *tube* berpenutup ulir 1,5 ml (*Cryo-tube*, Greiner). *Tube* tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair hingga proses pengeringbekuan dimulai. Proses pengeringbekuan diawali dengan pemasangan *tube* ke alat pengeringbekuan, selanjutnya mesin dijalankan dan proses pengeringbekuan berjalan hingga terbentuk tepung spermatozoa di dalam *tube* tersebut. Waktu pengeringbekuan 1, 2, 3 jam digunakan sebagai perlakuan. *Tube* selanjutnya dilepas dari mesin pengeringbekuan, ditutup rapat, divakum dengan menggunakan *syringe* 10 ml dan disimpan di dalam lemari es (3-5°C) selama 6 bulan.

Evaluasi status DNA spermatozoa

Pada penelitian ini dilakukan dua pendekatan untuk mengevaluasi integritas DNA spermatozoa domba setelah proses pengeringbekuan dan penyimpanan selama 6 bulan di dalam lemari es (3-5°C). Pendekatan pertama bertujuan untuk memprediksi kondisi DNA

spermatozoa secara tidak langsung berdasarkan perubahan struktur kromatin dengan menggunakan teknik pewarnaan *toluidine blue*. Pada pemeriksaan ini diungkap kondisi kondensasi kromatin berdasarkan perbedaan intensitas warna yang dihasilkan. Selama spermatogenesis, protein pelindung spermatozoa yang disebut histon akan digantikan oleh protamin. Perubahan ini akan menentukan kualitas proses kondensasi kromatin yang dapat dideteksi melalui teknik pewarnaan *toluidine blue*. Semakin kompak kondensasi yang terjadi, maka warna biru terang akan muncul, sebaliknya pada kondensasi yang kurang kompak warna biru gelap akan muncul (BELETTI dan MELLO, 2004). Kondensasi yang kurang kompak berkorelasi positif dengan abnormalitas kromatin dan DNA spermatozoa, seperti umumnya yang terdapat pada pasien pria infertil. Kondisi ini juga dapat terjadi pada spermatozoa yang terpapar oleh radikal bebas (AITKEN *et al.*, 1998) atau akibat apoptosis (GORCYZA *et al.*, 1993b).

Metode pewarnaan TB diawali dengan pembuatan preparat ulas spermatozoa pada gelas obyek. Preparat selanjutnya dikeringudarkan dan difiksasi di dalam etanol 96%-aseton (1 : 1) selama 30 menit pada suhu 4°C. Setelah difiksasi, preparat dikeringudarkan sebelum dihidrolisis di dalam HCl 0,1 N selama 5 menit pada suhu 4°C. Pewarnaan TB 0,05% dilakukan setelah preparat dibilas tiga kali dengan menggunakan *distilled water* (DW). Preparat yang telah diwarnai dicuci kembali dengan DW dan didehidrasi dengan menggunakan *t*-butanol dua kali serta dibersihkan dengan menggunakan *xylol* sebanyak dua kali. Preparat, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop cahaya menggunakan lensa obyektif 40X. Kepala spermatozoa yang integritas kromatinnya masih baik akan berwarna biru terang, sedangkan spermatozoa yang integritas kromatinnya sudah berkurang akan berwarna violet. Pemeriksaan dilakukan terhadap 200 spermatozoa untuk setiap perlakuan.

Sementara itu, pada pendekatan kedua yang menggunakan metode *comet assay* dapat dibedakan langsung secara visual antara DNA spermatozoa yang utuh dan DNA spermatozoa yang tidak utuh (mengalami fragmentasi) berdasarkan pembentukan komet setelah proses elektroforesis dan pewarnaan menggunakan *propidium iodide* (PI). Pada prosedur *comet assay* spermatozoa terlebih dahulu diinkubasi di dalam β-mercaptoetanol 2% yang umum digunakan untuk melisis sel guna mengisolasi DNA. Selain itu juga digunakan beberapa jenis detergen (Triton X-100 dan lauryl sarcosine) untuk melisis membran sel dan proteinase-K untuk memutuskan kompleks protein-DNA.

Evaluasi status DNA spermatozoa yang menggunakan prosedur *comet assay* dapat diuraikan sebagai berikut. Sampel spermatozoa yang akan diamati

dilisis terlebih dahulu dengan menggunakan β -mercapto-ethanol 2% selama satu jam di dalam lemari es (suhu 3-5°C). Selanjutnya sampel spermatozoa sebanyak 10 μ l dengan konsentrasi 10×10^5 spermatozoa per mililiter dicampur dengan 90 μ l *low melting point agarose* (LMA) 0,5%. Campuran tersebut selanjutnya ditambahkan ke dalam cetakan *agarose* pada gelas obyek yang terlebih dahulu diisi dengan 300 μ l *normal melting point agarose* (NMA) 0,75%. Gelas obyek selanjutnya ditempatkan pada lemari es hingga campuran tersebut memadat. Selanjutnya sampel dilisis dua kali masing-masing menggunakan *lysis buffer* yang mengandung NaCl 2,5 M, NaEDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 1% dan *sodium lauryl sarcosine* 1%, pH 10 selama satu jam pada lemari es dan *lysis buffer* yang mengandung NaCl 2,5 M, Tris-HCl 5 mM, *sodium lauryl sarcosine* 0,05% dan proteinase K 100 μ l/ml, pH 7,4 selama 1 malam pada suhu 37 °C. Setelah larutan proteinase-K ditiriskan dan dikeringkan serta diekuilibrasikan di dalam larutan NaOH 300 mM dan EDTA 1 mM, pH 13 (larutan alkali), sampel dimasukkan ke dalam bak *pulse field gel electrophoresis* (PFGE) yang berisi larutan alkali. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 10 V, 300 mA, E/W 10, N/S 10, selama empat jam. Selanjutnya sampel diangkat dan dicuci tiga kali dengan menggunakan larutan penetral Tris 0,4 M, pH 7,4 untuk menghilangkan alkali dan detergen. Setelah dinetralkan, sampel diwarnai dengan *propidium iodide* (20 μ g/ml) dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop fluoresens dengan filter TxRed (Ex = 540-580, DM = 595 dan BA = 600-660) (Nikon Eclipse E600, Japan). Spermatozoa dengan DNA utuh tidak memperlihatkan bias cahaya (komet), sedangkan spermatozoa dengan DNA yang tidak utuh akan memperlihatkan bias cahaya (komet). Jumlah spermatozoa yang diamati dalam setiap perlakuan adalah 100.

Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3×3 dengan lima ulangan dan satuan percobaannya adalah gelas obyek yang berisi preparat spermatozoa yang diamati. Faktor pertama adalah jenis medium pelarut spermatozoa yang terdiri atas medium EDTA, EGTA dan PBS. Sedangkan faktor kedua adalah waktu pengeringbekuan spermatozoa di dalam mesin pengeringbekuan yang terdiri atas satu, dua dan tiga jam.

Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah integritas DNA spermatozoa hasil pengeringbekuan dan spermatozoa segar dengan menggunakan metode pewarnaan *toluidine blue test* dan metode *comet assay*. Melalui metode pewarnaan *toluidine blue test* kepala spermatozoa yang integritas kromatinnya masih baik akan berwarna biru terang dan spermatozoa yang integritas kromatinnya sudah berkurang akan berwarna violet. Sedangkan melalui metode *comet assay* spermatozoa dengan DNA utuh tidak memperlihatkan bias cahaya (komet) dan spermatozoa dengan DNA yang tidak utuh akan memperlihatkan bias cahaya (komet). Data status DNA spermatozoa segar dan hasil pengeringbekuan dianalisis menggunakan *independent-samples T-test* yang terdapat di dalam program statistik SPSS versi 13 dengan taraf pengujian 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberadaan kromatin dalam inti sel sangat menentukan status DNA yang terikat erat pada protamin yang berfungsi sebagai pelindung bagi DNA inti. Perubahan yang terjadi pada kromatin akan berakibat pada perubahan status DNA, sehingga pemeriksaan kondisi kromatin dapat menggambarkan status DNA yang terdapat di dalam kromatin tersebut. Data hasil evaluasi integritas DNA spermatozoa domba dengan menggunakan teknik pewarnaan *toluidine blue* dan metode *comet assay*, masing-masing disajikan pada Tabel 1 dan 2, sedangkan data visualnya disajikan pada Gambar 1 (pewarnaan *toluidine blue*) dan Gambar 2 (metode *comet assay*).

Hasil pewarnaan *toluidine blue* menunjukkan bahwa persentase integritas kromatin spermatozoa segar (kontrol) berbeda nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan persentase spermatozoa hasil pengeringbekuan baik pada perlakuan EDTA-1, EDTA-2, EDTA-3, PBS-1, PBS-2, PBS-3 maupun EGTA-2, tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan EGTA-1 dan EGTA-3. Hal ini menunjukkan bahwa medium EGTA dan lama pengeringbekuan satu dan tiga jam (EGTA-1 dan EGTA-3) memberikan kondisi yang baik bagi perlindungan integritas kromatin spermatozoa selama proses pengeringbekuan dan penyimpanan selama 6 bulan di dalam lemari es. Sementara itu, diantara spermatozoa hasil pengeringbekuan, perlakuan EGTA-3 (98%) dan EGTA-1 (97%) menunjukkan persentase integritas kromatin spermatozoa yang tertinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan EDTA-2 (91%), PBS-1 (90%), PBS-2.

Tabel 1. Rata-rata persentase integritas kromatin spermatozoa domba hasil pengeringbekuan menggunakan metode pewarnaan *toluidine blue*

Perlakuan	Integritas kromatin (%)	
	Kompak	Tidak kompak
EDTA-1	186 (93) ^{bc}	14 (7) ^{bc}
EDTA-2	182 (91) ^b	18 (9) ^b
EDTA-3	188 (94) ^{bc}	12 (6) ^{bc}
EGTA-1	194 (97) ^{ac}	6 (3) ^{ac}
EGTA-2	190 (95) ^{bc}	10 (5) ^{bc}
EGTA-3	196 (98) ^{ac}	4 (2) ^{ac}
PBS-1	180 (90) ^b	20 (10) ^b
PBS-2	184 (92) ^b	16 (8) ^b
PBS-3	181 (91) ^b	19 (9) ^b
Spermatozoa segar	200 (100) ^a	0 (0) ^a

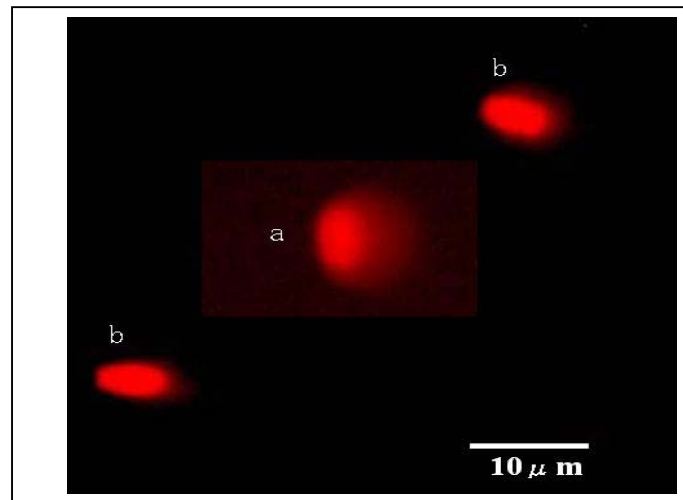
Superskrip berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf uji 5%
 1, 2, dan 3 = waktu pengeringbekuan
 Sumber: ERENPREISS *et al.* (2001)

Tabel 2. Rata-rata persentase integritas DNA spermatozoa domba hasil pengeringbekuan menggunakan metode *comet assay* (FRASER dan STRZEZEK, 2004)

Perlakuan	Integritas DNA (%)	
	Utuh	Tidak utuh
EDTA-1	85 (85) ^{bc}	15 (15) ^{bc}
EDTA-2	88 (88) ^{ac}	12 (12) ^{ac}
EDTA-3	89 (89) ^{ac}	11 (11) ^{ac}
EGTA-1	90 (90) ^{ac}	10 (10) ^{ac}
EGTA-2	92 (92) ^{ac}	8 (8) ^{ac}
EGTA-3	92 (92) ^{ac}	8 (8) ^{ac}
PBS-1	83 (83) ^{bc}	17 (17) ^{bc}
PBS-2	83 (83) ^{bc}	17 (17) ^{bc}
PBS-3	87 (87) ^{ac}	13 (13) ^{ac}
Spermatozoa segar	97 (97) ^a	3 (3) ^a

Superskrip berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf uji 5%
 1, 2, dan 3 = waktu pengeringbekuan (92%) dan PBS-3 (91%), tetapi tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan perlakuan EDTA-1 (93%), EDTA-3 (94%) dan EGTA-2 (95%)

**Gambar 1.** Integritas kromatin spermatozoa setelah pengeringbekuan dan pewarnaan *toluidine blue* (ERENPREISS *et al.*, 2001). Spermatozoa dengan inti pada kepala berwarna biru terang, kromatin utuh (a) dan spermatozoa dengan inti pada kepala berwarna biru gelap, kromatin tidak utuh (b)



Gambar 2. Integritas DNA spermatozoa setelah pengeringbekuan dan metode *comet assay* (FRASER dan STRZEZEK, 2004). Spermatozoa yang tidak membentuk komet, DNA utuh (b) dan spermatozoa yang membentuk komet (tanda panah), DNA tidak utuh (a)

Hasil evaluasi integritas DNA spermatozoa domba dengan menggunakan metode *comet assay* menunjukkan bahwa persentase integritas DNA spermatozoa segar (kontrol) berbeda nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan persentase integritas DNA spermatozoa hasil pengeringbekuan pada perlakuan EDTA-1, PBS-1 dan PBS-2, tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan EDTA-2, EDTA-3, EGTA-1, EGTA-2, EGTA-3 dan PBS-3. Hal ini menunjukkan bahwa EDTA dan EGTA cenderung mampu melindungi integritas DNA spermatozoa selama proses pengeringbekuan dan penyimpanan di dalam lemari es selama 6 bulan. Walaupun integritas DNA spermatozoa hasil pengeringbekuan secara keseluruhan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada semua perlakuan, EGTA-2 dan EGTA-3 mampu memberikan perlindungan yang terbaik (92%) terhadap integritas DNA spermatozoa hasil pengeringbekuan.

Senyawa EDTA dan EGTA adalah dua zat kimia yang dikenal baik sebagai *chelating agent*, yaitu senyawa kimia yang berperan sebagai penangkap ion-ion bebas yang berpotensi mengganggu kestabilan inti sel. EGTA berperan menekan fungsi kation divalen seperti kalsium (Ca^{2+}) dan magnesium (Mg^{2+}) yang mendukung kerja enzim endonuklease, sehingga proses pemutusan ikatan fosfodiester pada tubuh DNA oleh enzim endonuklease tidak terjadi (CLARK dan EICHHORN, 1974; KUSAKABE *et al.*, 2001). Gugus *tetra acetic acid* pada lengan struktur bangun EGTA dan EDTA mempunyai afinitas yang kuat untuk mengikat ion-ion bebas. Namun demikian, EDTA mempunyai afinitas yang kuat terhadap Mg^{2+} dibandingkan ion yang lain sedangkan EGTA mempunyai afinitas yang kuat

terhadap Ca^{2+} (ANONIM, 2005). Selain itu, konsentrasi EGTA dalam medium pelarut juga turut berperan untuk mengoptimalkan upaya mempertahankan integritas DNA spermatozoa. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi EGTA dan EDTA masing-masing 50 mM sesuai dengan hasil laporan KUSAKABE *et al.* (2001) bahwa konsentrasi EGTA 50 mM mampu mempertahankan integritas DNA spermatozoa mencit dengan baik dibandingkan dengan konsentrasi 10 mM. Lebih lanjut dikatakan bahwa oosit yang diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan menggunakan medium EGTA mampu berkembang menjadi embrio tahap blastosis bahkan dapat melahirkan anak yang normal setelah ditransfer ke resipien.

Aktivitas enzim endonuklease dalam merusak struktur DNA juga ditentukan oleh pH medium. Sebagai contoh, enzim endonuklease (DNase I) berfungsi optimal pada pH 7 dan stabil pada pH 5-6 sehingga jika dipapar pada medium dengan pH tinggi aktivitas enzim tersebut dalam merusak struktur DNA akan terganggu (KANEKO *et al.*, 2003). Pada penelitian ini digunakan pH medium yang sedikit bersifat alkali (pH 8) untuk semua jenis medium pelarut sesuai dengan laporan KANEKO *et al.* (2003) bahwa pelarut spermatozoa pada saat pengeringbekuan dengan pH 8,0 akan mampu mempertahankan integritas kromosom dan perkembangan spermatozoa lebih lanjut. Beberapa hal di atas diduga kuat menyebabkan adanya kecenderungan integritas kromatin dan DNA spermatozoa hasil pengeringbekuan terlebih dahulu dilarutkan pada medium yang mengandung EGTA atau EDTA dapat dipertahankan dengan baik dibandingkan

dengan spermatozoa yang dilarutkan di dalam medium PBS.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa medium EDTA dan EGTA mempunyai kecenderungan dapat mempertahankan dengan baik integritas kromatin dan DNA spermatozoa hasil pengeringbekuan dibandingkan dengan medium PBS dengan lama pengeringbekuan satu sampai tiga jam.

DAFTAR PUSTAKA

- AITKEN, R.J., E. GORDON and D. HARKISS. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and the genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1037-1046.
- ANONIM. 2005. The differences between EDTA and EGTA. <http://www.madsci.org/posts/archives/2001-02/983222932.Bc.r.html>. (30 Des 2005).
- BELETTI, M.E. and M.L.S. MELLO. 2004. Comparison between Toluidine Blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology* 62: 398-402.
- CLARK, P. and G.L. EICHORN. 1974. A predictable modification of enzyme specificity. Selective alteration of DNA bases by metal ions to promote cleavage specificity by deoxyribonuclease. *Biochemistry* 13: 5098-5102.
- CURRY, M.R. and P.F. WATSON. 1995. Sperm Structure and Function. *Dalam*: GRUDZINSKAS J.G. and YOVICH J.L. Eds. Gametes-The Spermatozoon. Cambridge University Press. New York. pp. 45-69.
- ERENPREISA, J., J. ERENPREISS, T. FREIVALDS, M. SLAIDINA, R. KRAMPE, J. BUTIKOVA, A. AVANOV and D. PJANOVA. 2003. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry* 52A: 19-27.
- ERENPREISS, J., J. BARS, V. LIPATNIKOVA, J. ERENPREISA and J. ZALKALNS. 2001. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J. Androl.* 22: 45-53.
- EVENSON, D.P., Z. DRAZYNKIEWICZ and M.R. MELAMED. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131-1133.
- FRASER, L. and J. STRZEZEK. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 42: 49-55.
- GORCYZA, W., J. GONG and Z. DRAZYNKIEWICZ. 1993a. Detection of DNA strand breaks individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res.* 53: 1945-1951.
- GORCYZA, W., F. TRAGANOS and H. JESIONOWSKA. 1993b. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 207: 202-205.
- KANEKO, T., D.G. WHITTINGHAM and R. YANAGIMACHI. 2003. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 68: 136-139.
- KUSAKABE, H., M.A. SZCZYGIEL, D.G. WHITTINGHAM and R. YANAGIMACHI. 2001. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *PNAS* 98: 13501-13506.
- MANICARDI, G.C., P.G. BIANCHI, S. PANTANO, P. AZZONI, D. BIZZARO, U. BIANCHI and D. SAKKAS. 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and it relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol. Reprod.* 52: 864-867.
- MOHAR, I., A.S. MONIKA, R. YANAGIMACHI and W.S. WARD. 2002. Sperm nuclear halos can transform into normal chromosomes after injection into oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 62: 416-420.
- PILIANG, W.G. dan S. DJOJOSOEBAJO. 1991. Fisiologi Nutrisi. Vol. 1. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas-Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- SAILI, T., M.A. SETIADI, S. AGUNGPRIYONO, M.R. TOELIHIRE, and A. BOEDIONO. 2006. Pengaruh pengeringbekuan terhadap perubahan morfologi spermatozoa domba. *Agriplus* 16: 107-117.
- SOTOLONGO, B., E. LINO and W.S. WARD. 2003. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol. Reprod.* 69: 2029-2035.
- TEJADA, R., J.C. MITCHELL, A. NORMAN, J.J. MARIK and S. FRIEDMAN. 1984. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42: 87-91.