

Pengaruh Tingkat Kerusakan Deoxyribonucleid Acid terhadap Keguguran pada Sapi

Effect of Deoxyribonucleic Acid Damage Rate on Cattle Miscarriage

L. Priyanto^{1*}, A. Budiyanto², A. Kusumawati² & Kurniasih²

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

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta DIY

*corresponding email : priyantolanggeng@gmail.com

ABSTRAK

Hubungan antara tingkat kerusakan DNA sperma dengan keguguran pada sapi belum banyak dilaporkan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan antara kerusakan DNA sperma dengan tingkat keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali, tingkat keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali belum banyak dilaporkan. Tingkat kerusakan DNA sperma diukur dengan Sperm-Bos-Halomax® dari dua straw sampel semen beku sapi Brahman (40002,40885) dan tingkat kebuntingan diukur dari tingkat keberhasilan inseminasi buatan pada 14 ekor sapi Brahman dan 14 ekor sapi Bali yang masing-masing dibagi menjadi dua kelompok. Satu kelompok sebanyak tujuh ekor diinseminasi buatan dengan semen pejantan 40002 dengan tingkat kerusakan DNA sperma 37,11 % dan satu kelompok lagi diinseminasi buatan dengan semen pejantan 40885 dengan tingkat kerusakan DNA sperma 10,66%. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kerusakan DNA sperma dengan tingkat keguguran. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tingkat kerusakan DNA sperma 37,11% ditemukan tingkat keguguran 14,31 % pada sapi Brahman dan 28,60 % pada sapi Bali, dengan pemeriksaan ultrasonografi (USG) pada hari ke-30 dan hari ke-45. Hasil penelitian pada tingkat kerusakan DNA sperma 10,66% tidak ditemukan keguguran pada pemeriksaan USG pada hari ke-30 dan USG pada hari ke-45. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa kerusakan DNA sperma 37,11 % memengaruhi keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali. Kerusakan DNA sperma 10,66 % tidak berpengaruh terhadap keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali.

Kata kunci: Kerusakan DNA sperma; tingkat keguguran; sapi Brahman, Sapi Bali

ABSTRACT

The relationship between the level of damage to sperm DNA with miscarriage in cattle has not been widely reported. The purpose of this study was to determine the relationship between sperm DNA damage with the rate of miscarriage in Brahman cows and Bali cows, the rate of miscarriages in Brahman cows and Bali cows has not been widely reported. The level of sperm DNA damage was measured by Sperm-Bos-Halomax® from two straw frozen semen samples of Brahman cattle (40002,40885) and pregnancy rate was measured from the success rate of artificial insemination in 14 Brahman cows and 14 Bali cows, each divided into two groups. One group consisted of seven artificial inseminated with 40002 male semen with 37.11% sperm DNA damage level and another group artificial inseminated with 40885 male semen with 10.66% sperm DNA damage level. The data obtained were analyzed descriptively by comparing damage to sperm DNA with miscarriage rates. The results showed that the level of damage to sperm DNA 37.11% found a miscarriage rate 14.31% in Brahman cattle and 28.60% in Bali cattle, by ultrasonography (USG) examination on the 30th day and 45th day. The results of the study on the level of damage to sperm DNA 10.66% found no miscarriage on USG examination on the 30th day and USG on the 45th day. Based on the results of research conducted it can be concluded that the damage of 37.11% sperm DNA affects miscarriages in Brahman cows and Bali cows. 10.6% sperm DNA damage does not affect miscarriage in Brahman cows and Bali cows.

Keywords: Sperm DNA damage; miscarriage rate; Brahman cattle, Bali Cows.

PENDAHULUAN

Keberhasilan program Inseminasi Buatan (IB) ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya adalah faktor sumber daya manusia (SDM), faktor betina dan faktor pejantan. Faktor pejantan ini menjadi tanggung jawab dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) dan Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) dan untuk mewujudkan hal ini perlu dilakukan pengujian kualitas semen beku, berdasarkan Badan Standarisasi Nasional (BSN) hanya diuji motilitas dan scoring individu (SNL, 2008). Balai Inseminasi Buatan yang ada sekarang hanya melakukan persyaratan kualitas semen yang akan dijadikan straw dengan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis.

Faktor kerusakan Deoxyribonucleic Acid (DNA) sperma sebagai salah satu penyebab keguguran belum menjadi bahan pertimbangan didalam penentuan kualitas straw di Indonesia. Menurut penelitian Evenson (2016) kerusakan DNA sperma yang tinggi akan menyebabkan rendahnya angka kebuntingan dan menyebabkan keguguran. Fertilisasi dengan sperma yang mengalami kerusakan DNA akan menyebabkan kematian embrio dan kemungkinan kanker pada keturunannya, sehingga deteksi kerusakan DNA pada spermatozoa menjadi penting (Agarwal dan said 2003).

Kerusakan Deoxyribonucleic Acid (DNA) sperma sangat berpengaruh terhadap fertilisasi, perkembangan preimplantasi dan perkembangan embrio (Lewis dan Aitken.,2005). Tingkat kerusakan DNA sperma sangat berpengaruh terhadap perkembangan embrio (Vassilev *et al.*, 2005) dan kerusakan DNA sperma berkorelasi positif

dengan tingkat keguguran (Serafini *et al.*,2016).

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). Standar kerusakan DNA sperma untuk sapi 10-20 % tidak direkomendasikan untuk fertilisasi, sedangkan untuk manusia lebih dari 30 % (Prinosilova *et al.*, 2012), Sedangkan menurut Evenson. (2016) standar kerusakan DNA sperma yang tidak direkomendasikan untuk fertilisasi pada babi 6 %, sapi 10-20 %, kuda 28 % dan manusia 25-30 %.

Kerusakan DNA sperma pada manusia jika melebihi 30-40 % akan menyebabkan infertilitas dan tidak disarankan untuk dijadikan semen beku (Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*,2000). Penelitian Meseguer *et al.*, (2011) kerusakan DNA sperma menyebabkan keguguran sebesar 6,9 % dan Serafine *et al.*, (2016) kerusakan DNA sperma menyebabkan kegugurann 2 % antara hari ke 30-45 setelah inseminasi buatan. Mempertimbangkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan tingkat kerusakan DNA sperma dengan tingkat keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali sangat penting dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Materi penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 14 straw semen beku sapi Brahman yang dikoleksi dari Balai Inseminasi Buatan Lembang Bandung (40885) dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10.66% dan 14 straw dari Balai Inseminasi Buatan Sembawa

Sumatera Selatan (40002) dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37.08%. Semen beku yang digunakan adalah semen beku yang telah disimpan selama 1 bulan lebih.

Perlakuan pertama tingkat kebuntingan diukur dari tingkat keberhasilan inseminasi buatan (IB) pada 14 ekor sapi Brahman betina dari BPTU Sembawa yang dibagi menjadi dua kelompok. Satu kelompok sebanyak 7 ekor di IB dengan pejantan 40002 dan satu kelompok lagi di IB dengan pejantan 40885. Perlakuan kedua tingkat kebuntingan diukur dari tingkat keberhasilan inseminasi buatan (IB) pada 14 ekor sapi Bali betina dari peternak Sembawa yang dibagi menjadi dua kelompok. Satu kelompok sebanyak 7 ekor di IB dengan pejantan 40002 dan satu kelompok lagi di IB dengan pejantan 40885.

Straw dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa (37.08% dan 10.66%) pada sapi Brahman selanjutnya dilakukan Inseminasi Buatan (IB) pada 14 ekor sapi Brahman dan 14 ekor sapi Bali dengan masing-masing tingkat kerusakan DNA spermatozoa yang berbeda. Pelaksanaan Ultrasonografi (USG) dilakukan pada hari ke 30 dan hari ke 45 setelah IB menggunakan USG BW-3000V (PT. Golden Lab International).

Metode Penelitian

Pengujian Kerusakan DNA Spermatozoa dengan Sperm-Bos-Halamax® Urutan pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa sapi menggunakan Sperm-Bos-Halamax® dilakukan sebagai berikut, langkah pertama semen diencerkan 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) 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).

Semen beku sapi Brahman dalam straw dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37,11% sebanyak 14 straw (40002) dan Semen

beku sapi Brahman dalam straw dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 10,66% (40885) digunakan untuk melakukan inseminasi buatan (IB) pada 14 ekor sapi Brahman dan 14 ekor sapi Bali 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.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan tingkat kerusakan DNA sperma dengan tingkat keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pada Tabel 1 menunjukkan kejadian keguguran pada umur kebuntingan 45 hari setelah inseminasi buatan sebesar 14.31 % pada sapi Brahman dan 28.60 % pada sapi Bali dengan tingkat kerusakan DNA spermatozoa 37.08 % pada pejantan 40002. Menurut Gunes *et al.* (2015) keguguran disebabkan oleh kerusakan DNA sperma dimana penggunaan protein paternal maupun maternal sangat dibutuhkan didalam proses awal embriogenesis baik untuk replikasi, transkripsi dan translasi (Memili dan First., 1999). Terjadinya kekurangan dan penyimpangan protein selama embriogenesis akan menyebabkan terganggunya perkembangan dan kelangsungan hidup embrio tersebut (Feugang *et al.*, 2009). Protein yang sangat berperan didalam perkembangan embrio adalah heath shock protein (HSP) 90

kDa. Menurut (Alvarez-Gallardo *et al.*, 2013) HSP 90 kDa tidak hanya terdapat pada sperma, tetapi juga terdapat pada embrio tahap awal. HSP 90 kDa dapat meningkatkan atau menurunkan ekspresi dari reseptor progesteron, aspek ini dapat mempengaruhi kadar progesteron sehingga mampu mempengaruhi didalam proses kebuntingan. Semakin tinggi HSP 90 kDa maka akan semakin tinggi progesteron dihasilkan diawal-awal kebuntingan. Menurut Matsuura dan Maeda (2006) protein dengan berat molekul berkisar 100 kDa pada spermatozoa babi mengandung materi yang efektif dalam mengaktivasi oosit dan pembelahan perkembangan embrio berikutnya. Sehingga dengan hilangnya kandungan protein kisaran 100 kDa akan menyebabkan terganggunya aktivasi oosit dan perkembangan embrio untuk tahap berikutnya. Menurut (Priyanto *et al.*, 2019) sangatlah penting kandungan protein didalam fertilisasi, aktivasi oosit dan perkembangan embrio berikutnya.

Tabel 1 menjadi bukti bahwa kerusakan DNA sperma 37.08 % pada pejantan 40002 menyebabkan keguguran. Proses keguguran tersebut dilapangan pada sapi akan menunjukkan kasus prolong estrus cycle, karena kerusakan DNA sperma sangat berpengaruh terhadap fertilisasi, perkembangan preimplantasi dan perkembangan embrio berikutnya (Lewis dan Aitken., 2005). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada tingkat kerusakan DNA sperma 37.08% dengan pemeriksaan USG di hari ke 30 (Gambar 1A) ditemukan tingkat kebuntingan 57.11 % pada sapi Brahman dan 71.40 % pada sapi Bali dan dengan pemeriksaan USG dihari

Tabel 1. Hubungan Kerusakan DNA Spermatozoa dengan Tingkat Keguguran

No	Pejantan	Resipien	Kerusakan DNA	USG 30 hari	USG 45 hari	TingkatKeguguran
1	40002	Brahman	37.08 %	57.11 %	42.80 %	14.31 %
2	40002	Bali	37.08 %	71.40 %	42.80 %	28.60 %
3	40885	Brahman	10.66 %	57.11 %	57.11 %	0 %
4	40885	Bali	10.66 %	85.70 %	85.70 %	0 %

Keterangan: Kerusakan DNA spermatozoa 37.08% (pejantan 40002 BIB Sembawa).

Kerusakan DNA spermatozoa 10.66% (pejantan 40885 BIB Lembang).

ke 45 (Gambar 1B) ditemukan tingkat kebuntingan 42.8% pada sapi Brahman dan 42.80 % pada sapi Bali. Penelitian Nakao *et al.* (1983) kejadian prolong estrus cycle di hari 30-60 hari setelah inseminasi buatan menyebabkan keguguran 17.9%.

Analisis kerusakan DNA sperma dapat mengungkapkan gangguan fertilitas pada pejantan selain pemeriksaan motilitas dan viabilitas. Kerusakan DNA sperma dapat menyebabkan kematian embrio. Kerusakan DNA sperma sangat berpengaruh terhadap fertilisasi, perkembangan preimplantasi dan perkembangan embrio (Lewis dan Aitken., 2005). Tingkat kerusakan DNA sperma sangat berpengaruh terhadap perkembangan embrio (Vassilev *et al.*, 2005) dan kerusakan DNA sperma berkorelasi positif dengan tingkat keguguran (Serafini *et al.*, 2016). Semakin tinggi tingkat kerusakan DNA sperma maka semakin tinggi tingkat kegugurannya.

Hasil penelitian pada tingkat kerusakan DNA sperma 10.66% ditemukan tingkat kebuntingan 57.1% pada sapi Brahman dan 85.70 % pada sapi Bali dengan USG dihari ke 30 dan tingkat kebuntingan 57.11% pada sapi Brahman dan 85.70 % pada sapi Bali dengan USG dihari ke 45 (Tabel 1). Kerusakan DNA

sperma 10.66 % tidak menyebabkan keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali.

Hal ini sesuai dengan penelitian Serafini *et al.* (2016) melaporkan kerusakan DNA sperma 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. Jadi pada penelitian Serafini *et al.* (2016) kerusakan DNA sperma 8+3 (6-15%) menyebabkan keguguran 2 % pada kerbau di Italia, sedangkan penelitian ini pada tingkat kerusakan DNA sperma 10.66% tidak menyebabkan keguguran walaupun tingkat kebuntingan lebih tinggi mencapai 57.08 % dan 85.70 % hal ini disebabkan species yang berbeda, jumlah sampel dan lingkungan yang berbeda pula. Penelitian Ahmadi *et al.* (1999) kerusakan DNA sperma < 8% tidak mempengaruhi perkembangan embrio selanjutnya, karena oosit mampu memperbaiki kerusakan DNA tersebut. Hasil penelitian ini, kebuntingan tidak mengalami keguguran pada kerusakan DNA sperma 10.66 % dan mengalami keguguran pada tingkat kerusakan DNA sperma 37.08 %, sebesar 14.31 % pada sapi Brahman dan 28.60 % pada sapi Bali (Gambar 1C).



Gambar 1. Citra USG perkembangan kebuntingan sapi (A) umur 30 hari (B) umur 45 hari (C) keadaan uterus tidak bunting (BW-3000V Made in Cina). Tanda panah menunjukkan adanya kebuntingan pada sapi (A dan B) dan uterus tidak bunting (C).

Hal ini sesuai dengan penelitian Karoui *et al.* (2012) pada sapi ditemukan kerusakan DNA sperma sekitar 7% sampai 10 % dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan inseminasi buatan yang paling rendah dengan menggunakan Sperm-Bos-Halomax (Halotech DNA, Madrid, Spain) dan pendapat Rybar *et al.* (2004) yang menyatakan standar kerusakan DNA sperma untuk sapi 10 % sampai 20 % tidak direkomendasikan untuk fertilisasi sedangkan untuk manusia lebih dari 30 % (Rybar *et al.*, 2004), Sedangkan menurut Evenson (2016) standar kerusakan DNA sperma yang tidak direkomendasikan untuk fertilisasi pada babi 6 %, sapi 10-20 %, kuda 28 % dan manusia 25-30 %. Kerusakan DNA sperma pada manusia jika melebihi 30-40 % akan menyebabkan penurunan tingkat kesuburan dan tidak disarankan untuk dijadikan semen beku (Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2000).

Hasil penelitian pada Tabel 1 tingkat kerusakan DNA sperma 37.08 % tidak disarankan untuk pembekuan dan untuk inseminasi buatan, karena menyebabkan

keguguran. Hal ini sependapat dengan penelitian (Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2000) kerusakan DNA sperma pada manusia jika melebihi 30-40 % akan menyebabkan kegagalan fertilisasi, implantasi, keguguran, penurunan tingkat kesuburan dan tidak disarankan untuk inseminasi buatan dan in vitro fertilisasi.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan tingkat kerusakan DNA sperma dengan tingkat keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali. Kerusakan DNA sperma berpengaruh terhadap tingkat keguguran. Kerusakan DNA sperma 10,66 % tidak menyebabkan keguguran pada sapi Brahman dan sapi Bali. Kerusakan DNA spermatozoa 37,11 % menyebabkan keguguran pada sapi Brahman 14,31% dan 28.60 % pada sapi Bali pada umur kebuntingan 45 hari. Kerusakan DNA sperma 37,11 % tidak

disarankan untuk digunakan inseminasi buatan pada sapi Brahman dan sapi Bali.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, A., Ng, S.C.** 1999. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Human Reproduction* 14(9): 2279-2285.
- Agarwal, A., & Said, T. M.** (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human reproduction update*, 9(4), 331-345.
- Alvarez-Gallardo, H., Kjelland, M. E., Moreno, J. F., Welsh Jr, T. H., Randel, R. D., Lammoglia, M. A., & Romo, S.** (2013). Gamete therapeutics: Recombinant protein adsorption by sperm for increasing fertility via artificial insemination. *PLoS one*, 8(6), e65083.
- Badan Standardisasi Nasional. Semen Beku Sapi.** SNI 4869, 1: 2008.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., & Claussen, O. P.** (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction*, 14(4), 1039-1049.
- 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.
- Feugang, J.M., Camargo-Rodriguez, O., & Memili, E.** 2009. Culture system for bovine embryos. *Livestock Sci* 121:141-149.
- 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 bo halomax (bright field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int. J Androl* 30(2):88-98.
- Gunes, S., Al-Sadaan, M., & Agarwal, A.** 2015. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive biomedicine online* 31(3): 309-319.
- Karoui, S., Diaz, C., Gonzalez-Marin, C., Amenabar, M.E., Serrano, M., Ugarte, E., Gosalvez, J., Roy, R., Lopez-Fernandez, C., & Carabano, M.J.** 2012. Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility. *J Anim Sci.* 90:2437-2449.
- Lewis, S.E., & Aitken, R.J.** 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on Memili, E., and First, N.L. 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod* 61:1198-1207.
- Matsuura, D., & Maeda, T.** (2006). Effects of Sperm Extract and its Molecular Weight Fractions on Oocyte Activation in Miniature Pig Spermatozoa. *Journal of Mammalian Ova Research* 23(3):122-127.
- Memili, E., & First, N.L.** 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod* 61:1198-1207.

- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., García-Herrero, S., Remohí, J., & Fernandez, J.L.** (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. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science* 45(4): 495-499.
- 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
- Priyanto, L., Budiyanto, A., Kusumawati, A., & Kurniasih, K.** (2018). Tingkat kerusakan DNA spermatozoa memengaruhi profil protein spermatozoa pada semen beku sapi Brahman. *Jurnal Veteriner*, 19(4), 512-520.
- Rybar, R., Faldikova, L., Faldyna, M., Machatkova, & M. Rubes, J.** 2004. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. *Veterinary Medicine* 49: 1-8.
- 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.
- Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., & Leter, G.** 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fer Ster* 73:43-50.
- Vassilev, N., Yotov, S., & Dimitrov, F.** 2005. Incidence of early embryonic death in dairy cows. *Trakia J of Scie* 3(5):62-64.