

Evaluasi Kerusakan DNA Spermatozoa Semen Cair Babi Menggunakan Pewarnaan Toluidine Blue

*(Evaluation of DNA Fragmentation of Boar Liquid Semen Spermatozoa
using Toluidine Blue Staining)*

**Hermilinda Parera^{1*}, Victor Lenda¹, Nancy Diana Foeh²,
Muhammad Mirandy Pratama Sirat³**

¹Program Studi Kesehatan Hewan, Jurusan Peternakan,
Politeknik Pertanian Negeri Kupang

²Laboratorium Klinik, Reproduksi, Patologi dan Nutrisi,
Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana, Kupang

³Fakultas Peternakan, Universitas Lampung

*Korespondensi Email : milindaparera81@gmail.com

ABSTRACT

The integrity of the deoxyribonucleic acid (DNA) in sperm plays a crucial role in the fertilization process and embryonic development. This study aimed to evaluate the level of the DNA fragmentation of boar sperm in tris-citrate-fructose extender preserved at temperatures between 16-18°C for 3 days. The level of sperm DNA damage was analysed using toluidine blue (TB) staining. Pig semen collected from 4 male pigs aged 1.3-1.8 years was used as the research sample. Semen collected was conducted twice a week. The experimental method using a Completely Randomized Design with 4 storage duration groups as follows: Group I (0 hours of storage), Group II (24 hours of storage), Group III (48 hours of storage), and Group IV (72 hours of storage), each with 5 replications. The data were analysed using analysis of variance (ANOVA) and, if significant differences were found, Duncan's test was performed. The results of the evaluation of the percentage of DNA damage during the storage process at 16-18°C at 0 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours was: $0.33 \pm 1.66\%$, $0.80 \pm 0.447\%$, $1.60 \pm 1.14\%$ and $2.80 \pm 0.447\%$, respectively. These results demonstrate that liquid boar semen preserved with tris citrate fructose extender at 16-18 °C for 3 days has spermatozoa DNA damage levels within the normal range, making it suitable for artificial insemination and ensuring optimal AI success.

Keywords : DNA boar sperm; toluidine blue staining; tris citrate fructose

PENDAHULUAN

Semen cair babi yang digunakan untuk pelaksanaan Inseminasi Buatan (IB) harus berkualitas untuk memberikan jaminan mutu semen cair kepada konsumen, serta

peningkatan mutu genetik dan produktivitas. Sesuai persyaratan mutu Standar Nasional Indonesia (SNI) 8034 tahun 2014 semen yang telah diawetkan pada suhu 16-18 °C

selama 3 hari harus menunjukkan motilitas minimal 40% dan gerakan individu minimal skor 2 (dua). Pengujian kualitas semen secara konvensional meliputi evaluasi makroskopis dan mikroskopis hanya memberikan gambaran umum terkait kualitas semen, namun tidak memberikan informasi terkait komponen terpenting seperti keutuhan DNA spermatozoa. Keutuhan DNA berperan penting dalam keberhasilan fertilisasi, perkembangan preimplantasi dan perkembangan embrio (Agarwal *et al.*, 2020).

Hilangnya kemampuan pejantan membuahi sel telur betina atau fertilisasi dapat didiagnosa dari awal menggunakan analisis dasar pada semen dengan mengevaluasi keutuhan DNA yaitu integritas kromatin (Kim *et al.*, 2013). Adanya kerusakan DNA atau DNA fragmentasi pada spermatozoa babi juga merupakan indikator penentuan kualitas spermatozoa dalam keberhasilan perkembangan embrio. Sejumlah faktor penyebab kerusakan DNA spermatozoa yaitu faktor dari dalam seperti: spermiogenesis, stress oksidatif, apoptosis yang gagal, ketidakseimbangan protamine dan faktor luar seperti suhu penyimpanan, pengencer, penanganan semen setelah ejakulasi, infeksi dan paparan zat kimia (González-Marín *et al.*, 2012; Kumaresan *et al.*, 2020).

Saat ini telah dikenal berbagai metode untuk mengevaluasi kerusakan materi genetik spermatozoa secara lebih kompleks

dan detail menggunakan sejumlah metode uji seperti *Sperm chromatin stability assay* (SCSA) (Evenson, 2016; Martí'nezmartí'nez-Pastor *et al.*, 2010), *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) *assay* (Lewis *et al.*, 2013), dan *sperm chromatin dispersion test* (SCD, Halomax®). Selain itu metode sitokimia telah dikembangkan dalam pewarnaan DNA spermatozoa seperti pewarnaan Toluidine Blue (TB). Metode ini secara tidak langsung merupakan metode pemeriksaan status DNA spermatozoa karena hanya memeriksa perubahan struktur kromatin yang terkait dengan stabilitas DNA spermatozoa. Metode ini menggunakan *cytochemical assays* yang terbukti sensitif untuk menguji struktur dan kemas pembungkus atau kromatin DNA (Erenpreisa *et al.*, 2003).

Toluidine blue (TB) adalah pewarna metakromatik tiazin dasar dengan afinitas tinggi terhadap residu DNA fosfat spermatozoa sehingga pewarna ini digunakan untuk mengevaluasi integritas kromatin spermatozoa dengan mendeteksi ada tidak pecahnya ikatan sulfida didalam kromatin. Pewarnaan ini merupakan teknik pewarnaan histologis untuk memvisualisasi fragmentasi DNA sel spermatozoa dan telah digunakan sebagai metode pemeriksaan Kerusakan DNA spermatozoa dari beberapa spesies untuk mengevaluasi derajat kondensasi kromatin (Monachesi *et al.*, 2019).

Pewarna TB akan mengikat gugus fosfat DNA, menghasilkan

warna biru. dibawah mikroskop DNA yang rusak tampak sebagai area berwarna biru tua, sedangkan DNA utuh tampak berwarna biru muda yang menyebar.

Sejumlah penelitian terkait penggunaan metode pewarnaan TB untuk mendeteksi kerusakan DNA spermatozoa telah dilakukan seperti pada semen segar dan semen beku sapi (Priyanto et al., 2015). Penelitian lain terkait penggunaan TB untuk mendeteksi kerusakan DNA spermatozoa pada anjing (Monachesi et al., 2019) dan penggunaan TB dan analin blue sebagai metode evaluasi kualitas spermatozoa dengan

mendeteksi kerusakan DNA Spermatozo manusia (Kim et al., 2013). Metode pewarnaan TB telah digunakan secara luas untuk evaluasi kerusakan semen dan metode ini terbukti cukup sederhana, mudah dan memiliki sensitivitas yang cukup tinggi, walaupun demikian penggunaannya masih sangat terbatas pada spermatozoa babi, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui presentase kerusakan DNA spermatozoa babi peranakan *duroc landrace* pada semen cair dengan pengencer tris sitrat fruktosa yang dipreservasi suhu 16-18 °C selama 3 hari.

MATERI DAN METODE

Sampel penelitian menggunakan semen babi yang dikoleksi dari 4 ekor babi pejantan dengan bangsa Peranakan *Duroc Landrace* milik peternak rakyat yang dipelihara dengan standar pemeliharaan yang baik dan merupakan pejantan yang biasa digunakan untuk penampungan semen. Umur pejantan 1,3-1,8 tahun Penampungan semen dilakukan 2 kali seminggu dengan metode masase.

Semen hasil penampungan dimasukkan dalam botol semen dan ditempatkan dalam wadah gelap dan tertutup agar mengurangi goncangan saat transportasi. Semen segera dibawa setelah penampungan ke laboratorium patologi anatomi Politeknik Pertanian Negeri Kupang yang berjarak ± 4 km.

Di Laboratorium Politeknik Pertanian Negeri Kupang dilakukan

pengujian kualitas semen segar meliputi evaluasi makroskopis yaitu volume, bau, warna, pH dan evaluasi mikroskopi meliputi motilitas, abnormalitas, viabilitas, membran plasma utuh dan integritas akrosom. Semen yang memenuhi syarat secara makroskopis maupun mikroskopis dengan motilitas >80% dan viabilitas >90% yang digunakan untuk tahap selanjutnya yaitu pengenceran.

Bahan pengencer yang digunakan terbuat dari tris aminomethane, asam sitrat, fruktosa, bovine serum albumin, aquabidest dan penisilin streptomisin sebagai antibiotik. Semen diencerkan sesuai dengan dosis IB selanjutnya semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 16-18 °C selama tiga hari. Pemeriksaan motilitas, viabilitas dan kerusakan DNA Spermatozoa

dilakukan setiap hari sampai pada hari ke -3.

Pengujian Keutuhan DNA merujuk pada Priyanto *et al.*, (2015) dimana semen diambil dan dibuat preparat ulas pada gelas objek, setelah itu, preparat dikering udarakan dan difiksasi dalam etanol 96%-aseton (1:1) selama 30 menit pada suhu 4 °C. Setelah fiksasi, preparat dikering udarakan lagi dan dihidrolisis dalam HCl 0,1 N selama lima menit pada suhu 4 °C. Setelah dibilas tiga kali menggunakan air suling, Preparat diwarnai dengan pewarna *toluidine blue* 0,05%, dan dibiarkan selama 10 menit. Preparat yang telah diwarnai dibilas dengan air suling dan didehidrasi menggunakan t-butanol dua kali, selanjutnya dibersihkan dengan xylol sebanyak dua kali. Setelah kering, preparat diamati di

bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Kepala spermatozoa akan berwarna biru terang bila memiliki integritas kromatin yang baik, sedangkan kepala spermatozoa dengan integritas kromatin yang rendah akan berwarna biru tua. Pemeriksaan dilakukan pada 100 spermatozoa untuk setiap sampel (Erenpreisa *et al.*, 2003).

Penelitian ini dirancang menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 kelompok lama penyimpanan pada suhu 16-18 °C, yaitu kelompok I: penyimpanan 24 jam: kelompok II: penyimpanan 48 jam dan kelompok III: penyimpanan 72 jam, dengan 5 ulangan. Data dianalisa dengan analysis of variance (ANOVA), bila terdapat beda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Pemeriksaan kualitas semen segar babi dilakukan setelah proses penampungan atau sebelum pengenceran untuk menentukan kelayakan semen tersebut dapat diproses lebih lanjut atau tidak. Pemeriksaan kualitas semen dilakukan secara makroskopis maupun mikroskopis. Hasil evaluasi kualitas semen segar selama penampungan dari 4 ekor babi pejatan peranakan *duroc landrace* dapat dilihat pada tabel 1.

Hasil evaluasi karakteristik semen segar babi peranakan *duroc landrace* dalam penelitian ini

diperoleh rerata volume 201,00±2,172 mL, berwarna putih susu, motilitas 80%, viabilitas 90%, konsentrasi 386 x 10⁶/ml. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya Parera & Lenda (2023), yang menunjukkan bahwa semen segar babi peranakan *duroc* memiliki volume 203,33±24,73 mL, berwarna putih susu, motilitas 90%, viabilitas 98% dengan konsentrasi 300 x 10⁶sel/mL. pH semen babi peranakan *duroc landrace* pada penelitian ini memiliki 7,3±0,509 tidak berbeda dengan hasil penelitian Foeh *et al.*, (2016) pH semen segar babi *duroc* 7,4±0,07. Menurut Shylesh *et al.*,

(2019) peningkatan alkalinitas semen dan derajat keasaman semen babi dipengaruhi oleh produksi sekret

glandula asesoria yang cukup tinggi dalam ejakulat seminal plasma.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kualitas semen segar babi peranakan *Duroc Landrace*

Pemeriksaan	Hasil
Makroskopis	
Volume	201,00±2,17 ml
Warna	Putih Susu
pH	7,3±0,509
Konsistensi	Cair
Bau	Khas Babi
Mikroskopis	
Gerakan Massa	+++
Motilitas	80%
Konsentrasi	386 X 10 ⁶ sel/mL
Abnormalitas	5,25±1.422%
Viabilitas	95%
MPU	97,67%
TAU	90%
DNA Utuh	99,6%

Keterangan: +++ = Sangat baik; terlihat seperti gelombang besar, banyak, gelap dan aktif

Evaluasi kerusakan DNA Spermatozoa Babi selama penyimpanan menggunakan Toluidine blue

Kerusakan DNA spermatozoa dapat menyebabkan rusaknya fungsi spermatozoa. Kerusakan DNA spermatozoa disebabkan oleh faktor internal dan faktor eksternal. Ausejo et al., (2022) menyebutkan faktor internal yang mempengaruhi kerusakan DNA spermatozoa babi seperti spermiogenesis, reaksi oksidatif, frekuensi ejakulasi dan lainnya serta faktor eksternal seperti suhu rendah, lama penyimpanan dan proses pengenceran (Kumaresan et al., 2020; Lin & Tsai, 2016). Pewarnaan toluidine blue digunakan untuk pemeriksaan struktur dan kemas DNA spermatozoa yang

tidak lengkap (Kim et al., 2013). Data hasil penelitian terkait pengaruh lama penyimpanan pada suhu 16-18°C terhadap kerusakan DNA spermatozoa babi disajikan pada Tabel 2.

Data menunjukkan persentase keutuhan DNA spermatozoa babi pada penyimpanan 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam berturut-turut adalah 99.65 %, 99.20%, 98.40% dan 97.20% atau dapat dikatakan persentase kerusakan DNA selama proses penyimpanan pada suhu 16-18°C pada jam ke 0, 24 jam, 48 jam dan 72 jam sebagai berikut; 0.33%, 0.80%, 1.60% dan 2.80%. Lama waktu penyimpanan semen cair babi pada suhu 16-18 °C berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap persentase keutuhan DNA spermatozoa.

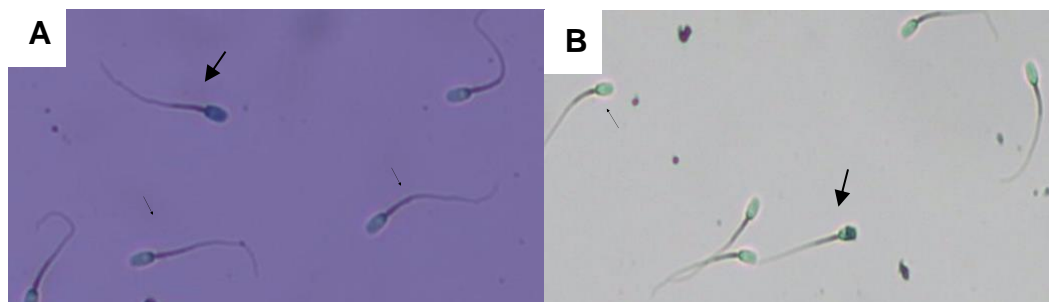
Semakin lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap penurunan persentase spermatozoa babi meskipun antara jam ke 0 sampai jam ke 48 penurunannya tidaknya berbeda nyata ($P>0,05$). Hal ini disebabkan karena semakin lama waktu penyimpanan maka *reactive oxygen species* (ROS) semakin banyak dihasilkan. ROS dapat bereaksi dengan basa nitrogen dalam DNA spermatozoa seperti adenin, guanin, sitosin, dan timin, menyebabkan modifikasi kimia pada struktur DNA spermatozoa sehingga mengganggu integritas dan stabilitas DNA spermatozoa (Juan *et al.*, 2021). ROS juga dapat menyebabkan pemutusan rantai ganda DNA spermatozoa melalui reaksi oksidasi yang berlebihan dan pemutusan rantai DNA ini dapat mengganggu integritas genetik dan fungsi sperma selain itu ROS juga dapat merusak protein dan lipid dalam spermatozoa babi akibat kerusakan ini menyebabkan fungsi normal spermatozoa terganggu dan mempengaruhi kemampuan sperma

untuk mempertahankan integritas DNA (Agarwal *et al.*, 2017). Pada penelitian ini kerusakan DNA spermatozoa babi cukup rendah dari 0 jam sampai 72 jam disebabkan karena penyimpanan pada suhu rendah 16-18°C dapat memperlambat metabolisme dalam spermatozoa, termasuk aktivitas dan reaksi kimia yang dapat menyebabkan kerusakan DNA. Penyimpanan semen pada suhu dingin dapat membantu menjaga integritas DNA spermatozoa. Adanya penambahan *bovine serum albumin* dalam pengencer semen tris citrat fruktosa dapat mensubstitusi protein semen saat pengenceran, mampu mencegah *coldshock*, dan juga berperan sebagai antioksidan (Bebas & Gorda, 2019). Bovine Serum Albumin berperan sebagai antioksidan seluler dengan menghubungkan ion logam transisional (Fe^{2+} dan Cu^{+}), sehingga meminimalisir pembentukan radikal OH (Abdelkhalek *et al.*, 2022; Akhter *et al.*, 2014).

Tabel 2. Persentase kerusakan DNA spermatozoa babi peranakan *Duroc Landrace* selama penyimpanan tiga hari pada suhu 16-18 °C

Status DNA Spermatozoa Babi	0 jam (%)	24 Jam (%)	48 Jam (%)	72 jam (%)
DNA Utuh	99,65±1,66 ^a	99,20±0,447 ^a	98,40±1,14 ^a	97,20±0,447 ^b
DNA Rusak	0,33±1,66 ^a	0,80±0,447 ^a	1,60±1,14 ^a	2,80±0,447 ^b

Keterangan: Superskrip huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$)



Gambar 1. A, B) Spermatozoa yang mengalami kerusakan DNA terwarnai biru tua (panah panjang); spermatozoa dengan DNA utuh terwarnai biru terang (kepala panah), evaluasi spermatozoa dengan pewarnaan toluidine blue (400x)

Pewarnaan *Toluidin Blue* (TB) dalam penelitian ini sudah pernah digunakan untuk mendeteksi kerusakan DNA spermatozoa pada semen beku dan semen segar sapi, semen domba, semen kucing dan semen manusia (Alves et al., 2018; Kim et al., 2013; Priyanto et al., 2015). Namun pewarnaan ini belum pernah dilaporkan penggunaannya pada spermatozoa babi. Pewarnaan TB merupakan metode evaluasi kerusakan DNA yang murah, mudah dan efisien dapat digunakan untuk analisis rutin kualitas spermatozoa terkait fertilitas pada hewan jantan seperti kuda, domba, kucing dan anjing (Rui et al., 2018).

Toluidine atau tolonium klorida adalah kelompok thiazine dan ditemukan oleh William Henry Perkin pada tahun 1856. Pewarna metakromatik ini secara selektif mewarnai komponen asam seperti sulfat, karboksilat, dan fosfat dalam sel atau jaringan. Oleh karena itu, pewarnaan toluidine blue ini

memiliki afinitas yang tinggi terhadap asam nukleat dalam kandungan DNA dan RNA yang berhubungan dengan struktur kromatin. Selama spermatogenesis histon sebagai protein pelindung spermatozoa akan digantikan dengan protamin sehingga proses perubahan ini akan menentukan kualitas kondensasi kromatin yang terjadi saat spermatogenesis. Kondensasi kromatin dapat dideteksi dengan teknik pewarnaan *toluidine blue* sehingga pada sperma dengan kondensasi kromatin DNA yang tidak padat atau longgar maka toluidine akan berikatan dengan residu fosfat DNA sehingga sperma tampak berwarna biru tua hingga magenta, sebaliknya apabila kondensasi kromatin DNA sperma sangat padat dan rapat maka toluidin tidak dapat berikatan dengan residu fosfat DNA dan sperma akan tampak berwarna hijau hingga biru muda (Nasr-Esfahani & Tavalae, 2021).

KESIMPULAN

Presentase kerusakan DNA spermatozoa babi pada semen cair dengan pengencer tris citrat fructosa yang dipreservasi suhu 16-18°C selama 3 hari dari hari ke 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam sebesar

0.33%, 0.80%, 1.60% dan 2.80%. Metode pewarnaan *toluidine blue* dapat digunakan sebagai metode yang efektif, murah dan efisien untuk penentuan kerusakan DNA spermatozoa babi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Pusat Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat (P3M) Politeknik Pertanian Negeri Kupang, yang telah membiayai penelitian ini melalui dana DIPA Politani Kupang Tahun 2023. Ucapan terima kasih kepada Jaydeni Pig

Semen dan Winder Boar Semen sebagai mitra penyedia semen babi dan terima kasih kepada staff PLP/Teknisi Laboratorium Anatomi Patologi Politani Kupang yang telah mendukung selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-khalek, A. E., Dowidar, Y. A., El-Nagar, H. A., Wafa, W. M., El-Ratel, I. T., & Mousbah, A. M. (2022). A Review on Various Antioxidants Utilized in Bovine Semen Extenders. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 7(12), 13–24. <https://doi.org/10.21608/jav.2022.115377.1120>
- Agarwal, A., Cho, C. L., Esteves, S. C., & Majzoub, A. (2017). Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Translational Andrology and Urology*, 6(9), S695–S696. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.05.40>
- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Selvam, M. K. P., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., ... Shah, R. (2020). Sperm DNA fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *World Journal of Men's Health*, 38(4), 412–471. <https://doi.org/10.5534/WJMH.200128>
- Akhter, S., Rakha, B., Iqbal, R., & Ansari, M. (2014). Effect of Bovine Serum Albumin on Motility, Plasmalemma, Viability and Chromatin Integrity of Buffalo Bull

- Spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(1), 115–120.
- Alves, I. P., Cancelli, C. H. B., Grassi, T. L. M., Oliveira, P. R. H., Franciscato, D. A., Carreira, J. T., & Koivisto, M. B. de. (2018). Evaluation of sperm head dimensions and chromatin integrity of epididymal sperm from domestic cats using the toluidine blue technique. *Animal Reproduction Science*, 197, 33–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.001>
- Ausejo, R., Martínez, J. M., Mendoza, N., Bolarin, A., Tejedor, M. T., & Falceto, M. V. (2022). Nuclear DNA Fragmentation in Boar Spermatozoa: Measurement Methods and Reproductive Performance Implications. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.929858>
- Bebas, W., & Gorda, W. (2019). Penambahan Bovine Serum Albumin pada Beltsville Thawing Solution Dapat Mempertahankan Kualitas Semen Babi yang Disimpan pada 15°C (Addition of Bovine Serum Albumin to Beltsville thawing Solution Could Maintain Quality of Pig Semen Stored at 15°C). *Jurnal Veteriner*, 20(3), 330–336. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.3.330>
- Erenpreisa, J., Erenpreiss, J., Freivalds, T., Slaidina, M., Krampe, R., Butikova, J., Ivanov, A., & Pjanova, D. (2003). Toluidine Blue Test for Sperm DNA Integrity and Elaboration of Image Cytometry Algorithm. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 52(1), 19–27. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10015>
- Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 56–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>
- Foeh, N. diana frederika katherina, Arifiantini, R. I., & Yusuf, T. laswardi. (2016). *Viabilitas spermatozoa semen beku babi duroc dalam extender BTS menggunakan krioprotektan gliserol*. 4, 24–32.
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14026–14052. <https://doi.org/10.3390/ijms131114026>
- Juan, C. A., de la Lastra, J. M. P.,

- Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (Ros) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (dna, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Kim, H. S., Kang, M. J., Kim, S. A., Oh, S. K., Kim, H., Ku, S. Y., Kim, S. H., Moon, S. Y., & Choi, Y. M. (2013). The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 40(1), 23–28. <https://doi.org/10.5653/cerm.2013.40.1.23>
- Kumaresan, A., Das Gupta, M., Datta, T. K., & Morrell, J. M. (2020). Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(6), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00321>
- Lewis, S. E., John A, R., Conner, S. J., ConIuliis, G. D., Evenson, D. P., Henkel, R., Giwercman, A., & Gharagozloo, P. (2013). The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive Biomedicine Online*, 27(4), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.014>
- Lin, C., & Tsai, S. (2016). The effect of cryopreservation on DNA damage, gene expression and protein abundance in vertebrate. *Italian Journal of Animal Science ISSN:*, 11(21), 119–122. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e21>
- Martínezmartínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Lvarez-Rodríguezrodríguez, M. A., Lvarez, M. A., Anel, L., & De Paz, P. (2010). *Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry*. 45(2), 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Monachesi, N. E., Neild, D., & Carretero, M. (2019). Dog sperm DNA: Raw semen evaluation with Toluidine blue stain. *Reproduction in Domestic Animals Zuchthygiene*, 54(8), 1078–1084. <https://doi.org/10.1111/rda.13490>
- Nasr-Esfahani, M., & Tavalae, M. (2021). *Sperm Chromatin Structure: Toluidine Blue Staining* (pp. 156–162). <https://doi.org/10.1017/9781108878715.021>
- Parera, H., & Lenda, V. (2023). Evaluation of Motility, Viability and Abnormality of Boar Spermatozoa in Various Modified Extenders. *Jurnal*

- Peternakan Ilmiah Terpadu*, 11(1), 13–33.
<https://jurnal.fp.unila.ac.id/index.php/JIPT/article/view/6508/4577>
- Priyanto, L., Arifiantini, R. I., Yusuf, T. L., Reproduksi, B., Kebidanan, D., & Hewan, K. (2015). Deteksi Kerusakan DNA Spermatozoa Semen Segar dan Semen Beku Sapi Menggunakan Pewarnaan Toluidine Blue (Detection Of Sperm DNA Damage Infresh and Frozen Semen Using Toluidine Blue Staining). In *Jurnal Veteriner Maret* (Vol. 16, Issue 1).
- Rui, B. R., Angrimani, D. S. R., Bicudo, L. C., Losano, J. D. A., Nichi, M., & Pereira, R. J. G. (2018). A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 171–175.
<https://doi.org/10.1111/rda.13087>
- Shylesh, T., Harshan, H. M., Wilson, M., Promod, K., Usha, A. P., Sunanda, C., & Unnikrishnan, M. P. (2019). Fresh Semen Characteristics of Large white Yorkshire Boar Semen Selected for Liquid Semen Preservation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(09), 1584–1590.
<https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.809.181>