

Kualitas Spermatozoa Ayam Bangkok Dalam Pengencer Ringer Laktat dan Air Kelapa yang Disuplementasi Kuning Telur dan Glukosa

Quality of Bangkok Chicken Spermatozoa in Lactate Ringer and Coconut Water Extender Supplemented with Egg Yolk and Glucose

Saefudding, Khaeruddin*, Bahri Syamsuryadi

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai

Jl. Teuku Umar No. 8, Biringere, Sinjai Utara 92611, Sulawesi Selatan, Indonesia

Email: erukhaeruddin@gmail.com

ABSTRAK

Pengawetan semen dapat dilakukan dengan cara pembekuan maupun penyimpanan dingin (*chilling*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh jenis pengencer semen terhadap kualitas spermatozoa ayam Bangkok, dan untuk mengetahui jenis pengencer yang paling baik digunakan untuk spermatozoa ayam Bangkok. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam taraf perlakuan (P1, P2, P3, P4, P5, P6) dengan empat kali ulangan. Taraf perlakuan yang digunakan yaitu: P1= Air Kelapa, P2= Air, Kelapa + Kuning Telur, P3= Air Kelapa + Kuning Telur + Glukosa, P4= Ringer Laktat, P5 = Ringer Laktat + Kuning Telur, P6= Ringer Laktat + Kuning Telur + Glukosa. Parameter yang diamati yaitu, motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan jenis pengencer berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa, viabilitas spermatozoa, dan abnormalitas spermatozoa. Kesimpulan penelitian ini yaitu pengaruh jenis pengencer semen terhadap kualitas spermatozoa ayam bangkok sangat signifikan terutama dengan penambahan komponen kuning telur. Jenis pengencer yang paling baik digunakan adalah pengencer air kelapa dengan tambahan kuning telur.

Kata kunci: Ayam Bangkok, Glukosa, Ringer Laktat, Semen

ABSTRACT

Semen preservation can be done by freezing or cold storage (chilling). The purpose of this study was to determine the effect of the type of semen extender on the quality of Bangkok chicken spermatozoa, and to determine the best type of extender used for Bangkok chicken spermatozoa. This study used a completely randomized design (CRD) with six treatment levels (P1, P2, P3, P4, P5, P6) with four replications. The treatment level used was: P1 = Coconut Water, P2 = Coconut water + Egg Yolk, P3 = Coconut Water + Egg Yolk + Glucose, P4 = Ringer Lactate, P5 = Ringer Lactate + Egg Yolk, P6 = Ringer Lactate + Egg Yolk + Glucose. Parameters observed were motility, viability, and abnormality. The results showed that the type of extender treatment had a very significant effect ($P < 0.01$) on spermatozoa motility, spermatozoa viability, and spermatozoa abnormalities. The conclusion of this study is that the effect of the type of semen extender on the quality of spermatozoa in Bangkok chickens is very significant, especially with the addition of egg yolk components. The best type of extender to use is coconut water extender with the addition of egg yolk.

Keywords: Bangkok Chicken, Glucose, Lactated Ringer's, Semen

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan plasma nutfah ayam lokal yang perlu dilestarikan. Ayam Bangkok merupakan salah satu jenis ayam lokal yang populer sebagai ayam petarung dan tersebar di

beberapa wilayah Indonesia (Nataamijaya *dkk*, 2010). Diperlukan teknologi yang dapat mempertahankan keberadaan ayam lokal dari masa ke masa. Teknologi pengawetan (preservasi) semen dapat menjadi alternatif dalam konservasi dan penyebarluasan plasma nutfah di Indonesia. Pengawetan semen dapat dilakukan dengan cara pembekuan maupun penyimpanan dingin (*chilling*). Pembekuan dapat menyebabkan spermatozoa awet hingga bertahun-tahun sedangkan pada *chilling* hanya bertahan beberapa jam atau hari. Salah satu syarat suatu semen dapat disimpan adalah adanya media pengencer yang sesuai. Menurut Siudzińska & Łukaszewicz (2008), prosedur yang paling umum untuk penyimpanan semen unggas jangka pendek (berjam-jam hingga berhari-hari pada suhu *refrigerator*) adalah membutuhkan bahan pengencer yang mampu mengawetkan spermatozoa.

Uji coba berbagai bahan pengencer semen ayam telah dikaji hingga bertahun-tahun yang lalu namun tidak sepopuler pengencer semen sapi. Di Indonesia beberapa peneliti mencoba pengencer sederhana dan murah sehingga aplikatif digunakan di lapangan. Cairan infus ringer laktat yang mudah didapatkan di apotik-apotik terdekat telah terbukti efektif sebagai pengencer semen ayam lokal Indonesia (Telnoni *dkk*, 2017; Kusumawati *dkk.*, 2018; Khaeruddin *dkk*, 2020b; Triadi *dkk*, 2022). Selain itu, bahan pengencer alami seperti air kelapa juga telah dibuktikan efektif sebagai pengencer semen ayam (Khaeruddin *dkk*, 2019).

Penyimpanan semen pada suhu rendah menyebabkan terjadinya *cold shock* yang dapat berakibat kematian pada spermatozoa, sehingga diperlukan bahan tambahan pengencer yang mampu melindungi membran sel dari efek *cold shock*. Menurut Santiago-Moreno *dkk.* (2012) kuning telur mampu melindungi spermatozoa ayam dari cold shock. Sehingga penambahan kuning telur dalam pengencer ringer laktat ataupun air kelapa berpotensi mampu menambah kemampuan pengencer dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa selama cooled storage.

Spermatozoa memanfaatkan energi untuk motilitas, yang terutama dalam bentuk ATP intraseluler yang dihasilkan oleh oksidasi substrat, fruktosa, glukosa, sorbitol, laktat, atau piruvat (Misro & Ramya, 2012). Glukosa dimetabolisme melalui jalur glikolisis dan fosforilasi oksidatif pada bagian tengah spermatozoa untuk menghasilkan adenosin triposfat (ATP) sebagai sumber energi untuk pergerakan ekor spermatozoa (Setiawan *dkk*, 2020). Seminal plasma unggas mengandung glukosa yang sangat rendah bahkan kadang-kadang tidak terdeteksi sama sekali (Lake & Wishart, 1984). Penelitian sebelumnya telah membuktikan efektifitas glukosa dalam mempertahankan kualitas spermatozoa ayam pada penyimpanan 5 °C (Khaeruddin *dkk.*, 2016) dan penyimpanan beku (Khaeruddin & Kurniawan, 2020). Untuk itu, penambahan glukosa sebagai sumber energi kemungkinan diperlukan dalam proses preservasi semen ayam lokal. Berdasarkan hal tersebut sehingga penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh jenis bahan pengencer semen terhadap kualitas spermatozoa ayam Bangkok.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam taraf perlakuan pengencer dan empat kali ulangan. Taraf perlakuan yang digunakan yaitu:

- P1: pengencer air kelapa
- P2: pengencer air kelapa + kuning telur
- P3: pengencer air kelapa + kuning telur + glukosa
- P4: pengencer ringer laktat
- P5: pengencer ringer laktat + kuning telur
- P6: pengencer ringer laktat + kuning telur + glukosa

Prosedur penelitian

Penyiapan Pengencer

Bahan pengencer yang digunakan adalah air kelapa muda, ringer laktat (PT. Widatra Bakti), kuning telur ayam ras dan glukosa (Merck, Jerman). Persentase kuning telur yang digunakan dalam pengencer adalah 10% (Khairuddin *dkk*, 2019). Masing-masing pengencer dibuat dengan mengikuti formula yang telah dirancang. Setelah pencampuran kuning telur dengan 90% ringer laktat atau air kelapa maka dilakukan pemisahan partikel menggunakan *centrifuge* sentrifius dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit, kemudian supernatan diambil dan endapan dibuang. Khusus glukosa ditambahkan sebanyak 0.9% pada supernatan setelah dilakukan sentrifugasi.

Koleksi Semen

Ayam Bangkok dewasa digunakan sebagai sumber semen yang dikoleksi 3 kali seminggu. Koleksi semen digunakan teknik pemijatan yaitu perangsangan pejantan dengan memijat bagian abdominal (Burrows & Quinn, 1937). Ayam yang terangsang ditandai dengan terangkatnya ekor, segera setelah terangkatnya ekor dilakukan pemerahan pada bagian kloaka hingga keluar cairan berwarna putih susu (semen). Semen ditampung menggunakan tabung kecil kemudian dibawa ke laboratorium untuk diencerkan.

Pengenceran dan Penyimpanan Semen

Semen dibagi kedalam enam tabung dan diencerkan dengan perbandingan lima bagian pengencer dan satu bagian semen. Semen yang telah diencerkan (semen cair) disimpan dalam wadah berisi air kemudian dimasukkan dalam kulkas dengan suhu 5° C selama 48 jam.

Parameter Penelitian

Motilitas Spermatozoa

Prosedur pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan secara subjektif berdasarkan Arifiantini (2012) yaitu setetes semen cair diletakkan di atas kaca preparat kemudian ditutup dengan kaca penutup. Selanjutnya diamati pergerakannya di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 40 kali.

Viabilitas Spermatozoa

Prosedur pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan secara objektif berdasarkan Arifiantini (2012) yaitu setetes semen cair diletakkan diatas kaca preparat kemudian ditetaskan eosin-nigrosin dan dihomogenkan. Selanjutnya campuran tersebut diapus pada kaca preparat lainnya. Preparat diamati di bawah mikroskop perbesaran 40 kali pada 10 lapang pandang. Dihitung jumlah sperma yang menyerap warna (mati) dan jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna (hidup). Rumus yang digunakan adalah:

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100$$

Abnormalitas Spermatozoa

Prosedur staining untuk pengamatan abnormalitas spermatozoa dilakukan seperti pada pengamatan viabilitas spermatozoa, pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 40x. Menghitung jumlah spermatozoa yang normal dengan sperma yang tidak normal dan dimasukkan dalam rumus:

$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100$$

Analisis Data

Analisis statistik yang digunakan adalah *analysis of variance* (ANOVA) jika ditemukan pengaruh perlakuan yang signifikan akan dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan. Analisis data menggunakan software SPSS 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan jenis bahan pengencer berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap motilitas spermatozoa ayam Bangkok yang disimpan pada suhu $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam (Tabel 1). Penambahan kuning telur dalam pengencer ringer laktat maupun air kelapa mampu meningkatkan motilitas spermatozoa. Sedangkan penambahan glukosa dalam pengencer yang mengandung kuning telur tidak menghasilkan perbedaan motilitas yang nyata baik pada ringer laktat maupun air kelapa.

Tabel 1. Hasil pengamatan motilitas setelah penyimpanan $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam

Perlakuan	Motilitas spermatozoa (%)
Ringer laktat	11.25±3.14 ^a
Ringer laktat + kuning telur	65.00±3.53 ^b
Ringer laktat + kuning telur + glukosa	61.25±4.56 ^b
Air kelapa	22.50±6.29 ^a
Air kelapa + kuning telur	50.00±10.60 ^b
Air kelapa + kuning telur + glukosa	65.00±2.39 ^b

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$).

Tingginya motilitas spermatozoa dengan penambahan kuning telur pada pengencer menunjukkan bahwa kuning telur mengandung zat yang berperan aktif melindungi spermatozoa selama penyimpanan. Hal ini sesuai dengan pendapat Santiago-Moreno *dkk.* (2012) bahwa kuning telur dapat melindungi spermatozoa ayam dari *cold shock*. Sejalan dengan pendapat Bustani & Baiee (2021) bahwa kuning telur adalah zat non-penetrasi utama yang digunakan untuk mengencerkan semen dan melindungi spermatozoa dari *cold shock* selama proses pendinginan. Kandungan *Low density lipoprotein* (LDL) dalam kuning telur diketahui mampu melindungi spermatozoa selama penyimpanan (Manjunath, 2012). Kuning telur berfungsi sebagai reservoir kolesterol dan fosfolipid yang membantu melindungi membran sel dan akrosom spermatozoa terhadap cedera kriogenik (Bustani & Baiee, 2021).

Efek menguntungkan kuning telur pada spermatozoa ayam dalam penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya. Penambahan kuning telur dalam pengencer ringer dekstroza lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa ayam Kampung yang disimpan pada suhu $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 10 jam (Azzam *dkk.*, 2022). Penambahan kuning telur dalam pengencer susu skim yang disimpan pada suhu $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam mampu mempertahankan motilitas spermatozoa ayam Kampung lebih baik dari pada tanpa kuning telur (Jatra *dkk.*, 2022).

Berdasarkan hasil penelitian ini, penggunaan pengencer air kelapa atau ringer laktat yang mengandung kuning telur, baik ada atau tidaknya glukosa mampu menghasilkan motilitas spermatozoa yang terbaik. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Khaeruddin *dkk.* (2019) dimana motilitas spermatozoa ayam tertinggi didapat dari penambahan komponen pelarut air kelapa, kuning telur, dan glukosa. Motilitas spermatozoa pada penelitian ini bahkan lebih tinggi dari beberapa penelitian sebelumnya. Khaeruddin *dkk.* (2020a) melaporkan motilitas spermatozoa ayam Kampung yang disimpan 48 jam hanya 10.2%. Sedangkan Khaeruddin & Amir (2019) melaporkan penggunaan pengencer ringer laktat-kuning telur-glukosa hanya mampu mempertahankan motilitas spermatozoa ayam kampung sebesar 6.67% selama penyimpanan 48 jam.

Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa merupakan persentase hidup spermatozoa yang dapat dibedakan reaksinya terhadap pewarna tertentu. Spermatozoa yang mati menghisap warna sedangkan

spermatozoa hidup tidak berwarna (Susilawati, 2011). Hasil pengamatan spermatozoa ayam Bangkok yang telah diwarnai dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Tabel 2. Hasil pengamatan viabilitas setelah penyimpanan 5 °C selama 48 jam.

Perlakuan	Viabilitas spermatozoa (%)
Ringer laktat	46.80±5.18 ^a
Ringer laktat + kuning telur	93.56±0.63 ^c
Ringer laktat + kuning telur + glukosa	90.25±3.11 ^c
Air kelapa	69.91±3.82 ^b
Air kelapa + kuning telur	90.50±4.26 ^c
Air kelapa + kuning telur + glukosa	93.92±1.22 ^c

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).



Gambar 1. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa ayam Bangkok dalam pengencer air kelapa (perbesaran mikroskop 40x). Lingkaran merah menunjukkan spermatozoa mati (menyerap warna), dan lingkaran putih menunjukkan spermatozoa hidup (tidak menyerap warna).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan jenis pengencer berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas spermatozoa. Penggunaan pengencer air kelapa menghasilkan viabilitas spermatozoa lebih tinggi jika dibandingkan ringer laktat, namun dengan penambahan kuning telur tidak menghasilkan perbedaan di antara keduanya. Penambahan kuning telur mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa lebih baik jika dibandingkan tanpa kuning telur. Berdasarkan hasil penelitian ini, penggunaan pengencer air kelapa atau ringer laktat yang mengandung kuning telur, baik ada atau tidaknya glukosa mampu menghasilkan motilitas spermatozoa yang terbaik.

Air kelapa lebih baik jika dibandingkan ringer laktat sebagai pengencer semen ayam karena mengandung komponen yang bermanfaat bagi spermatozoa. Menurut Reddy dan Lakshmi (2014), air kelapa mengandung 95% air, 5% gula yang terdiri dari glukosa, fruktosa, dan sukrosa. Glukosa dimetabolisme dan selanjutnya fosforilasi oksidatif pada bagian tengah spermatozoa menghasilkan adenosin triposfat (ATP) sebagai sumber energi (Setiawan *dkk*, 2020). Energi yang langsung digunakan untuk pergerakan spermatozoa dihasilkan oleh serabut ekor yang berasal dari penguraian ATP (Susilawati, 2011). Santos *dkk*, (2013) menyatakan bahwa air kelapa juga mengandung antioksidan seperti fenol dan asam askorbat (vitamin C).

Senyawa fenolik yang berasal dari buah, efektif mengikat radikal hidroksil, superoksida dan peroksil secara *in vitro* sehingga dapat mengurangi spesies oksigen reaktif (Rice-Evans, 2004).

Penelitian-penelitian sebelumnya menghasilkan viabilitas spermatozoa yang lebih rendah dari penelitian ini dengan waktu penyimpanan yang sama (48 jam). Hidayat *dkk*, (2021) menemukan viabilitas 74,63% pada spermatozoa ayam Pelung dengan pengencer ringer laktat kuning telur yang ditambahkan *sodium dodecyl sulphate* dan vitamin E. Demikian juga dengan Ulus *dkk*, (2019) yang mendapatkan viabilitas spermatozoa pada ayam Kampung sebesar 70,96% menggunakan pengencer NaCl dan tris kuning telur. Fitriyah *dkk*, (2019) juga menemukan viabilitas yang rendah pada spermatozoa ayam Magon menggunakan pengencer ringer laktat. Demikian juga dengan Khaeruddin dan Srimaharani (2019) yang menemukan bahwa spermatozoa ayam Kampung yang diencerkan dengan air kelapa menghasilkan viabilitas 0% (semua spermatozoa mati).

Viabilitas spermatozoa yang dihasilkan selama penyimpanan suhu 5 °C pada penelitian ini jauh lebih tinggi dari motilitas. Hal ini sesuai dengan pendapat Sarkar (2020) bahwa viabilitas spermatozoa yang tinggi biasanya ditemukan pada suhu rendah (sekitar 4 °C) karena mungkin terjadi penurunan aktivitas metabolisme sehingga memperpanjang daya hidup spermatozoa selama penyimpanan *in vitro*. Didukung oleh Gibb & Aitken (2016) pendinginan spermatozoa pada suhu antara 4-10 °C bertujuan untuk membatasi laju metabolisme selama penyimpanan. Sedangkan kisaran motilitas spermatozoa yang tinggi terjadi pada suhu 20-37 °C, jika suhu penyimpanan lebih rendah atau tinggi dari suhu tersebut akan menurunkan motilitas spermatozoa (Sarkar, 2020).

Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan yang terjadi pada morfologi spermatozoa. Presentase abnormalitas yang tinggi pada spermatozoa dapat menyebabkan infertilitas, karena spermatozoa yang memiliki struktur sel abnormal dapat menjadi salah satu faktor penghambat dalam proses fertilitas (Rahayu *dkk*, 2020). Pengamatan abnormalitas dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengamatan abnormalitas setelah penyimpanan 5 °C (48 jam).

Perlakuan	Abnormalitas spermatozoa (%)
Ringer laktat	44.03±5.64 ^a
Ringer laktat + kuning telur	28.71±6.49 ^b
Ringer laktat + kuning telur + glukosa	15.79±2.40 ^c
Air kelapa	29.09±3.69 ^b
Air kelapa + kuning telur	16.39±1.31 ^c
Air kelapa + kuning telur + glukosa	15.55±2.04 ^c

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan jenis pengencer berpengaruh sangat nyata (P<0,01) terhadap abnormalitas spermatozoa ayam Bangkok (Tabel 3). Penggunaan pengencer ringer laktat kuning telur glukosa, air kelapa kuning telur dan air kelapa kuning telur glukosa menghasilkan abnormalitas terendah di antara perlakuan. Penambahan kuning telur dalam pengencer ringer laktat atau air kelapa mampu mencegah peningkatan jumlah spermatozoa abnormal. Penambahan glukosa dalam pengencer ringer laktat kuning telur lebih mampu mencegah peningkatan jumlah spermatozoa abnormal jika dibandingkan tanpa glukosa. Sedangkan pengencer air kelapa atau air kelapa kuning telur lebih baik dalam menekan peningkatan spermatozoa abnormal jika dibandingkan pengencer ringer laktat atau ringer laktat kuning telur.

Abnormalitas yang diperoleh pada penelitian ini yaitu abnormalitas sekunder yang umumnya berupa pembengkakan (tekukan) pada bagian tengah. Menurut Suyadi dan Wahjuningsih (2021), bagian tengah spermatozoa ayam jauh lebih panjang dibandingkan spesies lain yang membuatnya memiliki lebih banyak tekukan di bagian tengah daripada spesies lain. Feyisa *dkk.* (2018) menyatakan bahwa bengkok, patah, dan menyimpul adalah kelainan bagian tengah yang paling umum diamati pada beberapa *breed* ayam.

Peneliti sebelumnya menunjukkan abnormalitas spermatozoa ayam yang bervariasi. Penelitian Siudzińska & Łukaszewicz (2008) menunjukkan abnormalitas spermatozoa 33,15% pada *black Minorca* menggunakan pengencer Lake. Sedangkan Nugroho & Saleh (2016) menemukan abnormalitas spermatozoa di bawah 12% pada spermatozoa ayam kampung menggunakan pengencer ringer laktat putih telur. Abnormalitas spermatozoa 15,79-16,39% pada penelitian ini masih layak untuk digunakan dalam inseminasi buatan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nugroho & Saleh (2016) bahwa abnormalitas spermatozoa di bawah 20% masih memenuhi persyaratan spermatozoa yang akan digunakan untuk inseminasi buatan.

KESIMPULAN

Jenis pengencer semen berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa ayam Bangkok selama penyimpanan 48 jam pada suhu 5 °C. Perlakuan terbaik berdasarkan data kualitas spermatozoa dan pertimbangan efisiensi bahan pengencer adalah penggunaan pengencer air kelapa kuning telur.

DAFTAR PUSTAKA

- Azzam, A. H., Raharjo, D., Hernawati, T., Madyawati, S. P., & Utomo, B. (2022). Combination of 5% Dextrose Ringer's solution and egg yolk extender maintained the motility and viability of kampung rooster spermatozoa in chilled temperature. *Ovozoa: J Anim Reprod*, 11, 109-14.
- Burrows, W. H., & Quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16(1), 19-24.
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220.
- Feyisa, S.G., Park, Y.H., Kim, Y.M., Lee, B.R., Jung, K.M., Choi, S.B., Cho, C.Y. & Han, J.Y. (2018). Morphological defects of sperm and their association with motility, fertility, and hatchability in four Korean native chicken breeds. *Asian-Australas J. Anim Sci.*, 31(8), 1160-1168.
- Fitriyah, F., Humaidah, N. & Suryanto, D. (2019). Pengaruh lama penyimpanan semen dalam pengencer Ringer's Lactat yang disimpan pada suhu 4 °C terhadap kualitas spermatozoa ayam Magon. *Jurnal Rekasatwa Peternakan*, 1(1), 28-37.
- Gibb, Z., & Aitken, R J. (2016). The Impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. *BioMed Research International*, 9380609.
- Hidayat, N., Hidayah, C.N., & Nugroho, A.P. (2021). Honey supplementation in lactate ringer-egg yolk extender on quality of pelung chicken spermatozoa post-chilling, *Jurnal Kedokteran Hewan*, 15(1), 7-10.
- Jatra, M. L. D., Saleh, D. M., & Mugiyono, S. (2022). Pengaruh penambahan kuning telur dalam susu skim disimpan pada suhu 5 derajat celcius selama 1 jam terhadap motilitas dan fertilitas spermatozoa ayam Kampung. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 11(2), 21-32.
- Khaeruddin, K., & Amir, M. (2019). The effect of the combination of glucose concentration with the type of extenders on the quality of native rooster spermatozoa during storage. *Chalaza Journal of Animal Husbandry*, 4(2), 36-43.
- Khaeruddin, A. N., Ardi, N., Fattah, A. H., & Armayanti, A. K. (2020a). Penentuan konsentrasi susu skim terbaik dalam pengencer semen ayam kampung berbahan dasar ringer

- laktat. *Jurnal Veteriner*, 21(2), 300-308.
- Khaeruddin, K., Arifiantini, R. I., Sumantri, C., & Darwati, S. (2016). Kualitas spermatozoa ayam peranakan sentul dalam pengencer ringer laktat kuning telur dengan berbagai monosakarida (Quality of Sentul crossbreed chicken spermatozoa in ringer lactate-egg yolk extenders supplemented with various monosaccharide). *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 10(2), 166-169.
- Khaeruddin, K., Hidayat, A., & Syamsuryadi, B. (2019). Preservasi semen ayam menggunakan pengencer air kelapa hijau dengan berbagai tingkat kematangan. *Agrominansia*, 4(2), 109-119.
- Khaeruddin, K., Junaedi, J., & Hastuti, H. (2020b). Cryopreservation of Indonesian native chicken semen by using dimethyl sulfoxide and various level of ethylene glycol as cryoprotectants. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(12).
- Khaeruddin, K., & Kurniawan, M. E. (2020). Keberhasilan pembekuan semen ayam yang diencerkan dan diperkaya dengan glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa. *Jurnal Veteriner*, 21(3), 476-484.
- Khaeruddin, K., & Srimaharani, S. (2019). Use of old coconut water with various skim concentrations of milk as an extender for kampung chicken semen. *Chalaza Journal of Animal Husbandry*, 4(1), 24-29.
- Khairuddin, K., Kurniawan, M. E., & Soman, S. (2019). Cryopreservation of Kampung rooster semen using egg yolk extender from four types of poultry with different concentrations. *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 13(3).
- Kusumawati, E. D., Woli, S. L., Krisnaningsih, A. T. N., Susanto, W. E., Rahadi, S., & Susilawati, T. (2018). Motilitas dan viabilitas spermatozoa ayam kampung pada suhu 5 °C menggunakan pengencer dan lama simpan yang berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 5(3), 102-105.
- Lake, P. E., & Wishart, G. J. (1984). Comparative physiology of turkey and fowl semen. In *Reproductive biology of Poultry* (Vol. 25, pp. 151-160). British Poultry Science Ltd Edinburgh.
- Manjunath, P. (2012). New insight into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components, *Anim Reprod*, 9(4), 809-815.
- Misro, M. M., & Ramya, T. (2012). Fuel/energy sources of spermatozoa. *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*, 209-223.
- Nataamijaya, A. G. (2010). Pengembangan potensi ayam lokal untuk menunjang peningkatan kesejahteraan petani. *Jurnal Litbang Pertanian*, 29(4), 131-138.
- Nugroho, A.P. dan Saleh, D.M. (2016). Motilitas dan abnormalitas spermatozoa ayam Kampung dengan pengencer Ringer Laktat-putih telur dan lama simpan pada suhu 5 °C selama 48 Jam, *Acta Veterinaria Indonesiana*, 4(1), 35-41.
- Parker, H.M., & McDaniel C.D. (2006). The immediate impact of semen extender and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange, and ionic balance of broiler breeder sperm, *Poult Sci*, 85, 106-116.
- Rahayu, S., Susilawati, T., & Soewondo, A. (2020). *Biologi Reproduksi: Kajian Seluler dan Molekuler*. Malang: UB Press.
- Reddy, E.P., & Lakshmi, T.M. (2014). Coconut water-properties uses nutritional benefits in health and wealth and health and disease: A review. *Journal of Current Trends in Clinical Medicine and Laboratory Biochemistry*, 2(2), 6-18.
- Rice-Evans C. (2004). Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radic Biol Med.*, 36, 827-828.
- Sangani, A.K, Masoudi, A.A., & Torshizi, R.V. (2017). Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow- and fast-growing roosters. *Poult Sci.*, 96, 211-219.

- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma M.A., López-Sebastián, A., Prieto, M.T., & Campo, J.L. (2012). Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm extenders. *Cryobiology*, 65(3), 230-234.
- Santos, J.L.A., Vanderson, S., Bispo, Adriano, B.C., Filho, Isabella, F.D., Pinto, Lucas, S., Danta, Daiane, F., Vasconcelos, Fabíula, F., Abreu, Danilo, A.M., Isaac, A.M., Florêncio, P.F., Osmar, F.G., Marisa, H.G., Medeiros, & Humberto, R.M. (2013). Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of coconut water (*Cocos nucifera* L.) and caffeic acid in cell culture. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 85(4), 1235-1246.
- Sarkar, P.K. (2020). Motility, viability and fertilizing ability of avian sperm stored under in vitro conditions. *Reviews in Agricultural Science*, 8, 15-27.
- Setiawan, R., Priyadarshana, C., Tajima, A., Travis, A. J., & Asano, A. (2020). Localisation and function of glucose transporter GLUT1 in chicken (*Gallus gallus domesticus*) spermatozoa: relationship between ATP production pathways and flagellar motility. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(7), 697–705.
- Siudzińska, A., & Łukaszewicz, E. (2008). Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(1), 101-108.
- Suyadi, S. & Wahjuningsih, S. (2021). *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Unggas*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Susilawati, T. (2011). *Spermatology*. Malang: UB Press.
- Telnoni, S. P., Arifiantini, R. I., Yusuf, T. L., & Darwati, S. (2017). SK Kedu semen cryopreservation in Beltsville poultry semen extender and lactated ringer's-egg yolk extender using dimethyl sulfoxide. *Asian J. Poult. Sci*, 11, 14-19.
- Triadi, T., Ervandi, M., Fahrullah, F., Repi, T., & Indrianti, M. A. (2022). Kualitas semen ayam KUB menggunakan pengencer Ringer Dextrose dan Ringer Laktat pada suhu 5 Celcius. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 11(1), 42-51.
- Ulus, E., Kusumawati, E.D., dan Krisnaningsih, A.T.N. (2019). Pengaruh pengencer dan lama simpan semen ayam Kampung pada suhu ruang terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa. *Jurnal Sains Peternakan*, 7(1), 29-40.