

## Penggunaan *Dimethyl Sulfoxide* Sebagai Krioprotektan dalam Pembekuan Semen Ayam Kampung

(THE USE OF DIMETHYL SULFOXIDE AS CRYOPROTECTIVE AGENT FOR NATIVE CHICKEN FROZEN SEMEN)

Junaedi<sup>1\*</sup>, Raden Iis Arifiantini<sup>2</sup>,  
Cece Sumantri<sup>3</sup>, Asep Gunawan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Sekolah Pascasarjana

<sup>2</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan,

<sup>3</sup>Bagian Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan,

Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan,

Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor,

Jln Agathis, Kampus IPB, Darmaga, Bogor, 16680, Indonesia

Telp. (0251) 8623940, \*email : [junaedi.peternakan@gmail.com](mailto:junaedi.peternakan@gmail.com)

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi krioprotektan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) yang terbaik pada pembekuan semen ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*). Semen yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tiga ekor ayam kampung. Semen segar dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Spermatozoa yang digunakan memiliki motilitas di atas 75% dengan konsentrasi di atas  $26 \times 10^8$ /mL. Semen diencerkan dengan Ringer laktat kuning telur (RLKT) dan penambahan tiga konsentrasi krioprotektan DMSO (5%, 7%, dan 9%). Semen dikemas kedalam *straw* 0,25 mL. Kemudian semen diekuilibrasi pada suhu 5°C selama dua jam. Selanjutnya dibekukan pada uap nitrogen cair selama 10 menit. Semen beku kemudian disimpan pada kontainer nitrogen cair dengan suhu -196°C. Setelah 24 jam, semen *dithawing* dengan suhu 37°C selama 30 detik. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa semen beku ayam kampung yang diencerkan dengan RLKT dengan penambahan krioprotektan DMSO 7% lebih baik ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan penggunaan DMSO 5% dan 9%. Setiap tahap pembekuan terjadi penurunan secara signifikan pada kualitas semen, terutama antara ekuilibrasi dan *thawing*. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi DMSO 7% pada pengencer Ringer laktat kuning telur adalah konsentrasi terbaik pada pembekuan semen ayam kampung.

Kata-kata kunci: semen beku, ayam kampung, *dimethyl sulfoxide* (DMSO)

### ABSTRACT

This study aim was to determine the best dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration for native chicken's (*Gallus gallus domesticus*) frozen semen. Semen was collected from three native chickens and then evaluated macroscopically and microscopically. Spermatozoa that used in this study had more than 75% sperm motility and more than  $25 \times 10^8$  mL in sperm concentration. Semen was divided into three equal tubes and each of them diluted with Ringer lactate egg yolk (RLEY) extender consisted of 5, 7 and 9% of DMSO. Diluted semen was added into 0.25 mL of mini straw, then equilibrated at 5 °C for two hours. The semen was then frozen placed in liquid nitrogen vapors for 10 min. Finally, the semen was put into liquid nitrogen with a temperature of -196°C. Post thawing quality semen was assessed after 24 hours storage by thawing the straw in warm water (37 °C) for 30 seconds. Data were analyzed using one-way analysis of variance. The results demonstrated that the sperm motility and viability diluted with RLEY extender with 7% DMSO was better ( $p < 0.05$ ) than those in 5 or 9% DMSO. Semen quality decreased at every step of freezing, especially between equilibration and thawing. Its concluded that 7% was the best DMSO concentration for freezing of native chicken semen in Ringer lactate egg yolk extender compared to 5% and 9%.

Keywords: frozen semen, native chicken, DMSO

## PENDAHULUAN

Ayam kampung merupakan ternak yang sangat umum dijumpai di Indonesia dan mempunyai potensi yang tinggi sebagai penghasil daging dan telur. Mengingat keanekaragaman hayati dari ternak ayam kampung cukup besar, terbuka peluang untuk melakukan pemuliaan agar dapat dihasilkan *parent stock*. Salah satu program dalam pemuliaan ayam adalah seleksi ayam pejantan, dapat dilakukan di antaranya dengan menguji kualitas semen ayam tersebut. Pejantan dengan kualitas semen yang jelek dapat menyebabkan fertilitas telur rendah dan sebaliknya untuk semen kualitas baik, menghasilkan persentase telur fertil yang lebih baik.

Salah satu upaya pelestarian plasma nutfah ayam kampung adalah dengan kriopreservasi semen, bertujuan memperpanjang daya hidup spermatozoa dengan cara dibekukan. Teknik kriopreservasi menjadi alat yang sangat berharga bagi industri unggas (Fulton 2006) dan untuk keberhasilan pelestarian sumber daya genetik unggas yang masih ada. Masalah yang sering dihadapi dalam proses pembekuan spermatozoa adalah *cold shock* dan kerusakan spermatozoa akibat terbentuknya kristal es. Kerusakan sel spermatozoa dapat diminimalisir dengan penambahan bahan pengencer semen yang mengandung sumber nutrisi, larutan penyangga, bahan *anticold shock*, antibiotik, dan krioprotektan.

Krioprotektan yang digunakan harus mudah larut dalam air dan harus mempunyai bobot molekul yang kecil agar lebih cepat menyusup ke dalam sel dan mengurangi toksisitas akibat osmolaritas yang tinggi (Alvarenga *et al.*, 2005). Jenis dan konsentrasi krioprotektan yang tepat dalam bahan pengencer sangat penting untuk melindungi spermatozoa selama pembekuan. Krioprotektan dibutuhkan untuk mencegah pembentukan kristal es, akan tetapi juga bersifat toksik pada saat ekuilibriasi dan setelah *thawing*. (Suidzinska dan Lukaszewicz, 2008).

Krioprotektan yang umum digunakan pada pembekuan semen ayam adalah gliserol. Namun, Saleh (2004) melaporkan bahwa penggunaan gliserol sebagai krioprotektan pada proses pembekuan memberikan hasil yang sangat buruk pada tingkat fertilitas ayam kampung. Gerzilov (2010) melaporkan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) dapat digunakan pada

pembekuan semen unggas. Senyawa DMSO adalah campuran organosulfur dengan rumus kimia  $(CH_3)_2SO$  dan mempunyai bobot molekul rendah yaitu 78,13 g/mol sehingga lebih cepat masuk ke dalam sel pada proses pembekuan semen. Senyawa DMSO juga memiliki titik beku yang tinggi yang dapat mencegah pembentukan kristal es. Konsentrasi DMSO dalam pengencer semen bervariasi, pada semen itik kadar terbaik adalah 10% (Han *et al.*, 2005), sedangkan pada ayam *white leghorn*, *ovambo*, dan *Potchefstroom koekoek* konsentrasi terbaik adalah 5% (Makhafola *et al.*, 2009). Mekanisme bagaimana DMSO melindungi spermatozoa ayam pada proses pembekuan semen belum banyak dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji konsentrasi DMSO sebagai krioprotektan pada pembekuan ayam kampung dalam pengencer Ringer laktat kuning telur.

## METODE PENELITIAN

Ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*) jantan yang digunakan sebagai sumber semen dalam penelitian ini telah dewasa kelamin, berumur satu tahun, berbadan sehat, memiliki kualitas semen terbaik, dan berjumlah tiga ekor. Semen ayam kampung ditampung dua kali seminggu dengan total penampungan sebanyak sembilan kali. Seluruh ayam dikandangkan secara individu dengan ukuran 60 x 60 x 80 cm, diberi 150 g/hari pakan komersial (PT. Gold Coin Indonesia). Kandungan nutrisi pakan yaitu 17% protein kasar, 2229,40 Kkal energi metabolisme, 6% serat kasar, 3% lemak, 14% abu, 0,6-1% phosphor, dan 3,0-4,2% kalsium. Pemberian air minum secara *ad libitum*.

Sebelum penelitian dilakukan, ayam kampung jantan diadaptasikan selama dua bulan terhadap kolektor semen maupun pada lingkungan kandang. Penelitian ini dilaksanakan di Kandang Pemuliaan Ternak Unggas, Fakultas Peternakan IPB dan di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR), Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan IPB.

### Prosedur Penelitian

**Persiapan Bahan Pengencer.** Bahan pengencer menggunakan *buffer* ringer laktat dan kuning telur. Ringer laktat kuning telur dihomogenkan menggunakan *stirer* selama lima menit kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Supernatan

Tabel 1. Komposisi bahan pengencer semen beku yang digunakan

Komposisi	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (DMSO)		
	5 %	7 %	9 %
Ringer Laktat (mL)	8,5	8,3	8,1
Kuning Telur (mL)	1	1	1
DMSO (mL)	0,5	0,7	0,9
Penisilin (IU/mL)Streptomisin (mg/mL)	10001	10001	10001
Total Pengencer (mL)	10	10	10
Tekanan osmotik (mOsmol/kg)	738	1010	1042
pH	6,8	6,8	6,8

Keterangan : Tekanan osmotik pengencer diukur menggunakan osmometer.

digunakan sebagai pengencer dasar dan ditambahkan dengan tris *tris hydroxymethyl aminomethane* (tris) untuk mendapatkan pH 6,8. Bahan dasar pengencer kemudian ditambahkan DMSO (Tabel 1).

**Koleksi Semen Segar.** Koleksi semen ayam dilakukan sembilan kali. Penampungan semen menggunakan teknik pengurutan (*masase*) dimulai dari bagian punggung ayam dan pada 1 cm dibelakang kloaka. Sebelum koleksi bagian kloaka dibersihkan dengan tisu yang diberi NaCl fisiologi. Koleksi semen dilakukan oleh dua orang, satu orang memegang ayam dan melakukan *masase*, satu orang lainnya bertindak sebaik kolektor semen. *Masase* dilakukan beberapa kali sampai terjadi rangsangan pada ayam yang ditandai dengan peregangan tubuh ayam dan keluarnya *papillae* dari *proktodaeum* kloaka. Ketika ereksi mencapai maksimal, dilakukan kembali *masase* hingga terjadi ejakulasi. Kolektor semen menampung semen hasil ejakulasi.

**Evaluasi Semen Segar.** Setelah koleksi, semen segera dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi secara makroskopis dilakukan terhadap volume, warna, konsistensi, dan derajat keasamaan (pH). Volume semen diukur dengan menggunakan pipet ukur, pH semen diukur menggunakan pH *special indicator paper*. Konsistensi semen dibedakan antara kental dan sedang, dan warna dibedakan menjadi putih, putih susu atau krem dilihat secara visual. Evaluasi secara mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas spermatozoa, konsentrasi spermatozoa per mL, spermatozoa hidup, dan morfologi spermatozoa.

Gerakan massa spermatozoa dinilai dengan cara meneteskan semen segar pada gelas objek lalu diamati di bawah mikroskop cahaya.

Penilaian dilakukan berdasarkan tebal tipisnya gelombang massa serta kecepatan gelombang massa berpindah tempat, dengan kriteria penilaian sangat baik (+++/3), baik(++/2), lumayan (+/1), buruk (tidak ada gelombang).

Motilitas spermatozoa ditentukan dengan cara meneteskan satu tetes semen yang ditambah 8-10 tetes NaCl fisiologi. Motilitas spermatozoa dinilai secara estimasi dari lima lapang pandang yang dinyatakan dalam persentase. Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan kamar hitung *Neubauer*, dengan pengenceran 500 kali (998  $\mu$ L formolsalin dengan 2  $\mu$ L semen).

Persentase spermatozoa hidup dievaluasi dengan menggunakan zat warna eosin nigrosin. Satu tetes semen ditambah 8-10 tetes eosin nigrosin. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400 kali, pada 10 lapang pandang. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna. Abnormalitas spermatozoa dilakukan menggunakan pewarnaan yang sama dengan spermatozoa hidup. Abnormalitas spermatozoa dihitung minimal 200 sel berdasarkan perhitungan 10 lapang pandang (Arifiantini *et al.*, 2005). Persentase spermatozoa yang abnormal dibedakan berdasarkan abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder (Alkan *et al.*, 2002).

**Pengolahan Semen.** Semen yang menunjukkan motilitas spermatozoa lebih dari 75% dengan konsentrasi spermatozoa lebih dari  $25 \times 10^8$  per mL, dibagi ke dalam tiga tabung. Masing-masing tabung diencerkan dengan pengencer Ringer laktat kuning telur (RLKT) dengan DMSO 5% (RLKT<sub>5</sub>), RLKT DMSO 7% (RLKT<sub>7</sub>) dan RLKT DMSO 9% (RLKT<sub>9</sub>) dengan dosis  $50 \times 10^6$  per 0,25 mL. Semen yang diencerkan dikemas ke dalam *mini straw* (Minitub,

Germany) 0,25 mL dan disusun dalam rak pembekuan. *Straw* berisi semen selanjutnya diekuilibrasikan pada suhu 5°C selama dua jam (Bearden *et al.*, 2004), dibekukan pada uap nitrogen cair selama 10 menit (Han *et al.*, 2005), kemudian disimpan pada kontainer nitrogen cair (-196 °C) hingga pengujian berikutnya.

**Pengujian Kualitas Semen Beku.**

Pengujian kualitas semen beku dilakukan 24 jam setelah penyimpanan, dengan cara melakukan *thawing* semen beku dalam air hangat (37°C) selama 30 detik. Pengujian dilakukan terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa seperti yang dilakukan pada semen segar. Keberhasilan pembekuan juga dinilai dengan *Recovery rate* (RR) yaitu persentase spermatozoa yang berhasil pulih dari proses pembekuan.

$$RR = \frac{\text{Persentase spermatozoa motil setelah thawing}}{\text{Persentase spermatozoa motil semen segar}} \times 100$$

**Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

Penelitian didisain menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga konsentrasi DMSO (5%, 7%, dan 9%) dan sembilan ulangan. Motilitas dan viabilitas spermatozoa dianalisis menggunakan sidik ragam/*analysis of variance* (Anova). Jika ditemukan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1995). Data diolah menggunakan program IBM SPSS versi 21.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Kualitas Semen Segar Ayam Kampung**

Semen segar ayam kampung yang digunakan dalam penelitian, mempunyai kualitas baik dan berada pada kisaran normal (Tabel 2). Secara makroskopis volume semen ayam kampung yang diperoleh adalah 0,20±0,01 mL, lebih rendah dari volume ayam kampung yang dilaporkan oleh Ervandi (2011) dan Danang *et al.* (2012) masing-masing 0,4 mL dan sebanyak 0,3 mL. Volume semen ayam hasil penelitian ini lebih banyak dibandingkan volume semen ayam pelung yaitu 0,14 mL (Widya *et al.*, 2013). Perbedaan volume semen ayam tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan genetik dan lingkungan.

Derajat keasaman (pH) semen ayam kampung termasuk netral dengan rata-rata 7,06 ±0,33, berwarna putih, konsistensi yang

kental. Kekentalan dan warna menginterpretasikan bahwa konsentrasi spermatozoa tinggi. Konsentrasi spermatozoa ayam kampung yang didapat adalah 3126±84,22 juta/mL. Hasil penelitian ini hampir sama yang dilaporkan oleh Danang *et al.*, (2012) 3130 juta/mL semen ayam kampung, ayam arab 3100 juta/mL (Ervandi 2011), dan 3000 juta/mL pada ayam Filipina (Saleh 2004). Konsentrasi spermatozoa ayam kampung lebih besar dibandingkan ayam bantam 1830 juta/mL (Malik *et al.*, 2013). Konsentrasi spermatozoa sangat penting untuk menentukan dosis inseminasi buatan.

Secara mikroskopis gerakan massa termasuk baik (+++). Gerakan massa mencerminkan gerakan individu spermatozoa. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, semen akan mempunyai kualitas yang semakin baik. Gerakan massa semen yang baik seperti awan tebal dan bergerak cepat.

Motilitas semen segar ayam kampung yaitu 83,88±0,61%. Motilitas berada dalam kisaran yang normal yaitu di atas 70% (Dumpala *et al.*, 2006). Motilitas semen segar ayam kampung lebih rendah dibandingkan semen segar kalkun (88,06%) berdasarkan laporan Slanina *et al.* (2012). Motilitas ayam kampung lebih besar dibanding ayam *broiler* 74,67±1,45% (Tabatabaei *et al.*, 2011), ayam hutan merah (55,2%), dan ayam bantam (49%) (Malik *et al.*, 2013). Perbedaan hasil kualitas semen ini, disebabkan oleh perbedaan individu dan umur ayam, suhu lingkungan, pakan, dan frekuensi

Tabel 2. Rataan nilai karakteristik semen segar ayam kampung

Karakteristik Semen	Rataan ±SEM
<b>Makroskopis</b>	
Volume (mL)	0,20 ± 0,01
pH	7,06 ± 0,33
Warna	Putih
Kekentalan/konsistensi	Kental
<b>Mikroskopis</b>	
Gerakan Massa	+++
Motilitas Spermatozoa (%)	83,88 ± 0,61
Viabilitas Spermatozoa (%)	91,14 ± 0,72
Konsentrasi Spermatozoa (Juta/mL)	3126 ± 84,22
Abnormalitas Spermatozoa (%)	7,33 ± 0,91
Abnormalitas Primer	1,43 ± 0,27
Abnormalitas Sekunder	5,90 ± 0,85
Tekanan Osmotik (mOsmol/kg)	252



penampungan semen. Hal ini sesuai dengan pendapat Froman dan Kirby (2008) yang menyatakan kualitas semen dipengaruhi oleh bangsa, individu, umur, ukuran badan, nutrisi pakan, dan frekuensi penampungan semen. Motilitas spermatozoa merupakan salah satu indikator ukuran kemampuan spermatozoa membuahi ovum dalam proses fertilisasi.

Viabilitas spermatozoa ayam kampung adalah  $91,14 \pm 0,72\%$  lebih tinggi dibandingkan dengan viabilitas spermatozoa *parent stock* ayam ras yaitu  $82,3 \pm 5,9\%$  (Castillo *et al.*, 2010) dan ayam *broiler*  $90,42 \pm 3,72\%$  (Tabatabaei *et al.*, 2011). Viabilitas spermatozoa hasil penelitian ini lebih besar dari laporan penelitian semen ayam kampung sebelumnya yaitu  $86\%$  (Dadang dan Sugiyatmo, 2007). Persentase spermatozoa hidup lebih tinggi dari pada spermatozoa motil karena dari jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semuanya motil progresif (Kostaman dan Utama, 2006).

Morfologi spermatozoa ayam kampung yang abnormal ditemukan  $7,33 \pm 0,91\%$ . Dengan abnormalitas primer  $1,43 \pm 0,27\%$  dan abnormalitas sekunder  $5,90 \pm 0,85\%$ . Nilai ini relatif kecil bila dibandingkan dengan laporan Dadang dan Sugiyatmo (2007)  $8,5\%$  pada ayam kampung,  $14,75\%$  pada ayam arab oleh Iskandar *et al.*, (2006), dan  $15,50\%$  pada ayam pelung (Widya *et al.*, 2013). Bentuk abnormal dari spermatozoa pada penelitian ini kebanyakan abnormalitas sekunder seperti ekor bergulung, leher patah, leher putus, dan ekor berganda. Abnormalitas sekunder disebabkan perlakuan

ketika pembuatan preparat ulas dan faktor lingkungan lainnya (Solihati *et al.* 2008), sedangkan menurut Arifiantini *et al.* (2005) spermatozoa abnormal biasanya disebabkan karena ketidakseimbangan nutrisi dan endokrin.

Abnormalitas spermatozoa yang tinggi dapat memengaruhi fertilitas. Morrellet *al.* (2008) melaporkan bahwa angka fertilitas berkorelasi kuat dengan morfologi normal spermatozoa. Hal tersebut disebabkan karena spermatozoa abnormal kesulitan dalam menembus zona pelucida (Mitchell *et al.*, 2006). Hal ini sesuai Saacke (2008) yang menyatakan spermatozoa dengan abnormalitas bagian kepala akan menghasilkan embrio berkualitas rendah dan mudah berdegenerasi.

**Kualitas Semen Beku Ayam Kampung**

Pengujian kualitas semen pada penelitian ini dilakukan pada semen segar, setelah ekuilibrasi dan setelah *thawing*. Hasil penelitian menunjukkan sampai dengan setelah ekuilibrasi pada berbagai konsentrasi DMSO yang ditambahkan dalam pengencer RLKT, tidak memengaruhi motilitas spermatozoa. Viabilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi menunjukkan konsentrasi DMSO  $7\%$  ( $85,74 \pm 1,07\%$ ) paling tinggi ( $P < 0,05$ ). Hal ini disebabkan kadar DMSO yang terlalu rendah tidak akan bekerja secara maksimal sedangkan kadar DMSO yang terlalu tinggi dapat bersifat toksik bagi spermatozoa, sehingga menyebabkan kematian spermatozoa. Prinsip kerja DMSO dalam pembekuan semen

Tabel 3 Kualitas semen beku ayam kampung pada berbagai tahapan pembekuan pada pengencer ringer laktat kuning telur pada berbagai dosis *dymethhyl sulfoxide* (DMSO)

Tahapan pembekuan	Konsentrasi DMSO		
	5	7	9
Semen segar			
Motilitas (%)	$83,89 \pm 0,61$	$83,89 \pm 0,61$	$83,89 \pm 0,61$
Viabilitas (%)	$91,14 \pm 0,72$	$91,14 \pm 0,72$	$91,14 \pm 0,72$
Setelah ekuilibrasi			
Motilitas (%)	$71,67 \pm 2,76$	$73,89 \pm 1,11$	$70,00 \pm 2,35$
Viabilitas (%)	$80,35 \pm 1,32^a$	$85,74 \pm 1,07^b$	$78,73 \pm 1,51^a$
Setelah <i>thawing</i>			
Motilitas (%)	$28,89 \pm 2,20^a$	$37,22 \pm 1,30^b$	$32,96 \pm 2,09^a$
Viabilitas (%)	$45,63 \pm 1,80^a$	$54,47 \pm 1,96^b$	$48,64 \pm 1,92^a$

Keterangan: Huruf berbeda yang mengikuti angka pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ).

yaitu molekul molekul DMSO yang kecil masuk ke dalam sel spermatozoa untuk mengganti air dalam sel spermatozoa. Kristal-kristal es yang terbentuk di dalam medium pengencer pada waktu pembekuan dapat dicegah dengan penggunaan konsentrasi DMSO yang tepat (Gerzilov, 2010).

Kualitas semen beku setelah *thawing* menunjukkan motilitas (37,22±1,30%) dan viabilitas spermatozoa ayam (54,47±1,96%) pengencer yang diberi DMSO 7% paling tinggi (P<0,05). Konsentrasi terbaik DMSO 7% pada penelitian ini, hampir sama dengan yang dilaporkan oleh Han *et al.* (2005) pada semen itik yang dapat mencapai motilitas hingga 38,30%. Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi DMSO yang tepat pada pengencer semen beku yaitu DMSO 7%. Hal ini sejalan dengan pendapat Han *et al.* (2005), bahwa konsentrasi krioprotektan pada semen beku tidak boleh terlalu tinggi karena dapat menyebabkan cairan spermatozoa dalam sel mengalami dehidrasi yang berat. Konsentrasi krioprotektan yang rendah menyebabkan pengeluaran cairan dari dalam sel mengalami keterlambatan sehingga pembekuan semen tidak sempurna.

Proses kerja krioprotektan DMSO dalam pengencer semen yaitu menggantikan air di dalam sel sehingga pada saat pembekuan tidak terbentuk kristal es yang berbahaya (Valerdi *et al.*, 2009). Kuning telur yang ditambahkan pada pengencer juga berperan penting pada proses pembekuan semen ayam. Kandungan lesitin pada kuning telur mampu melindungi spermatozoa terhadap *cold shock*. Komponen lipid utama berupa kolestrol (Botham dan Mayes, 2009) dalam kuning telur, serta struktur lipoprotein kuning telur mirip dengan struktur

membran plasma sehingga dapat melindungi membran sel spermatozoa.

Keberhasilan pembekuan selain dilihat dari kualitas semen setelah *thawing*, juga dapat dinilai dari banyaknya spermatozoa yang berhasil pulih kembali dari proses pembekuan yang disebut *recovery rate* (RR). Ketiga ayam jantan tersebut, terlihat bahwa masing-masing individu mempunyai RR yang berbeda. Ayam jantan ke-3 ternyata memiliki RR lebih tinggi (P<0,05). Nilai RR ayam lebih kecil dibanding pada itik 73,12% (Han *et al.*, 2005). Spermatozoa ayam sangat mudah rusak karena bentuk morfologi kepala yang lonjong. Kerusakan spermatozoa memengaruhi nilai RR, sehingga pengencer dan konsentrasi DMSO yang tepat mutlak dibutuhkan.

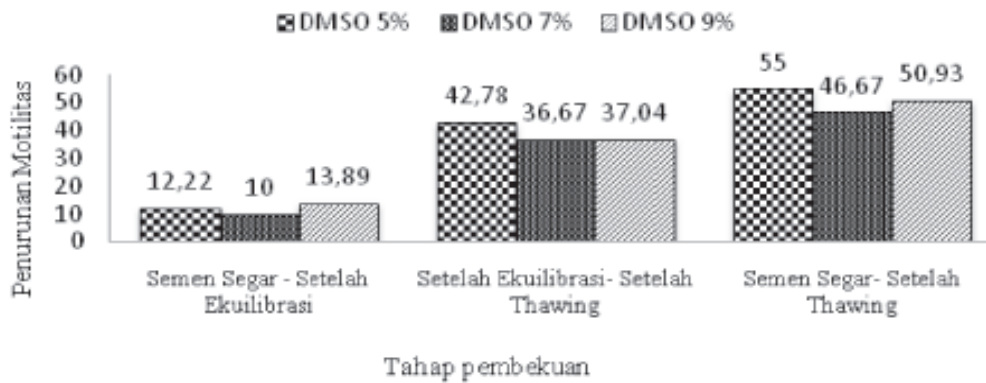
Tanpa memerhatikan pengaruh individu nilai RR, pada semen dengan pengencer DMSO 7% paling tinggi(44,45±1,78%). Spermatozoa yang dibekukan menggunakan pengencer DMSO 7% lebih banyak spermatozoa yang berhasil pulih setelah proses pembekuan. Krioprotektan dibutuhkan untuk mencegah pembentukan kristal es, akan tetapi krioprotektan juga bersifat toksik pada saat ekuilibrasi dan setelah *thawing* (Arifiantini *et al.*, 2007).

Uji tekanan osmotik menunjukkan bahwa semen segar pada ayam kampung memiliki nilai 252 mOsmol/kg (Tabel 2). Pengujian tekanan osmotik berguna untuk menentukan konsentrasi DMSO yang tepat digunakan pada pembekuan semen. Hasil pengujian tekanan osmotik pada pengencer semen adalah 738-1042 mOsmol/kg (Tabel 1) menunjukkan tekanan osmotik yang cukup tinggi dibandingkan tekanan osmotik semen ayam. Hasil pengujian tekanan osmotik pengencer dengan penam-

Tabel 4 *Recovery rate* spermatozoa semen beku ayam kampung dalam pengencer Ringer laktat kuning telur pada berbagai konsentrasi *dymethhyl sulfoxide* (DMSO)

Konsentrasi DMSO	Individu Ayam			Rataan
	1	2	3	
5%	30,43±6,08	32,68±3,46	39,97±1,26	34,36±2,50 <sup>A</sup>
7%	44,03±2,43	41,17±2,99	48,14±3,03	44,45±1,78 <sup>B</sup>
9%	35,87±3,35	38,56±4,71	43,21±3,92	39,21±2,28 <sup>AB</sup>
Rerata	36,78±2,90 <sup>a</sup>	37,47±2,27 <sup>ab</sup>	43,77±1,89 <sup>b</sup>	39,34±1,46

Keterangan: Huruf berbeda yang mengikuti angka pada kolom (huruf kapital) dan baris (bukankapital) yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05).



Gambar 1 Penurunan persentase motilitas spermatozoa ayam kampung pada setiap tahap pembekuan

bahan DMSO didapatkan pengencer semen beku ayam dengan tekanan osmotik ideal yaitu 1010 mOmol/kg. Tekanan osmotik yang ideal didapatkan dari penambahan konsentrasi DMSO 7% pada pengencer semen beku. Berdasarkan hasil tersebut terlihat bahwa bahan pengencer mempunyai tekanan yang hiperosmotik. Tingginya tekanan osmotik di luar sel akan menyebabkan keluarnya air dari dalam sel sehingga menyebabkan sel mengkerut dan cairan sel yang keluar diganti oleh krioprotektan (Souhoka *et al.*, 2009).

**Penurunan Kualitas Spermatozoa Semen Beku Ayam Kampung**

Pada proses pembekuan, spermatozoa mengalami perubahan suhu yang sangat ekstrim. Penelitian ini mengevaluasi penurunan motilitas mulai dari semen segar sampai setelah *thawing* (Gambar 1). Pengukuran penurunan motilitas setiap tahap pembekuan semen ayam kampung bertujuan untuk mengetahui titik kritis dari pembekuan semen ayam. Pengetahuan tentang penurunan motilitas pada pembekuan semen sangat penting karena dianggap sebagai salah satu parameter yang paling sering digunakan untuk mengevaluasi fertilitas spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki penurunan sangat tinggi menandakan bahwa kualitas spermatozoa tersebut kurang baik untuk digunakan pada inseminasi. Penurunan kualitas spermatozoa pada setiap tahap pembekuan dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa dan kualitas pengencer semen yang digunakan (Tremellen, 2008).

Penurunan motilitas semen segar hingga setelah ekuilibrasi persentasenya kecil, antara 10,00-13,89%. Setelah ekuilibrasi hingga setelah *thawing* penurunan motilitas semen sangat

besar yaitu 36,67-42,78% sehingga total penurunan dari semen segar ke setelah *thawing* menjadi 46,7-55,0%. Penurunan motilitas spermatozoa akibat pembe-kuan terkait dengan kerusakan mitokondria. Motilitas spermatozoa bergantung pada fungsi mitokondria. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Dziekonska *et al.* (2009) bahwa *Adenosine Tri Phosphate* (ATP) dihasilkan oleh fosforilasi oksidatif di dalam membran mitokondria dan ditransfer ke mikrotubulus untuk motilitas. Hal ini sesuai pendapat Tremellen (2008) bahwa rusaknya membran plasma mitokondria spermatozoa mengakibatkan terganggunya metabolisme sel spermatozoa, sehingga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa.

**SIMPULAN**

Senyawa DMSO 7% merupakan konsentrasi terbaik pada pengencer ringer laktat kuning telur untuk semen beku ayam kampung. Penurunan kualitas terbesar proses pembekuan semen ayam kampung terjadi pada tahap setelah ekuilibrasi hingga setelah *thawing*.

**SARAN**

Senyawa DMSO 7% dapat digunakan pada pengencer semen beku ayam. Diperlukan penelitian lebih lanjut uji kualitas spermatozoa secara *in vivo* pada ayam kampung dengan penggunaan krioprotektan DMSO. Selain itu perlu dilakukan penelitian lanjut menggunakan krioprotektan lain agar kerusakan spermatozoa ayam akibat toksisitas bisa dikurangi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi (DIKTI) atas bantuan biaya penelitian, kepada Pak Dadang selaku pegawai teknisi di Fakultas Peternakan IPB yang telah membantu pemeliharaan ayam kampung percobaan, Bondan Ahmadi selaku staf pegawai di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR), Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Saudara Muktakin, Khaeruddin, dan Numan atas bantuannya selama penelitian berlangsung.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alkan S, Baran A, Banu, Evecan M. 2002. Morphological defects in Turkey semen. *J Vet Anim Sci* 26: 1087-1092.
- Arifiantini I, Yusuf TL, Graha N. 2005. Recovery rate dan longivitas pasca *thawing* semenbeku sapi FH (Friesian Holstein) menggunakan berbagai bahan pengencer. *Buletin Peterernakan* 29(2): 53-61.
- Arifiantini I, Supriatna I. 2007. Stallion semen cryopreservation using different cryoprotective agents on the skim milk trehalosa extender. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 12(2): 139-146.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim FC. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen. *Anim Reprod Sci* 89: 105-113.
- Bearden HJ, Furguay JW, Willard ST. 2004. *Applied Animal Reproduction*. 6<sup>th</sup> Ed. New Jersey. Pearson Education.
- Botham KM, Mayes PA. 2009. Pengangkutan dan Penyimpanan Lipid. Dalam: Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. *Biokimia Harper*. Ed ke-27. Pendit BU, penerjemah. Jakarta (ID): EGC. Hlm. 225-238.
- Castillo A, Rombi I, Marzoni M. 2010. Preliminary investigation on fertility and hatchability by the use of cryopreserved cock semen. *Av Biol Res* 3: 127-128.
- Dadang MS, Sugiyatno. 2007. Pengaruh atas gliserol terhadap motilitas dan fertilitas spermatozoa ayam kampung yang dibekukan dengan nitrogen cair. *Anim Product* 1411-2027.
- Danang DR, Isnaini N, Trisunuwati P. 2012. Pengaruh lama simpan semen terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dalam pengencer ringer's pada suhu 4°C. *J Ternak Tropika* 13(1): 47-57
- Dumpala PR, Parker HM, Daniel MC. 2006. The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of Broiler breeder semen. *J Poult Sci* 5: 838-845.
- Dziedońska A, Fraser L, Strzeżek J. 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J Anim and Feed Sci* 18: 638-649.
- Ervandi M. 2011. Pengaruh bangsa ayam terhadap kualitas dan fertilitas spermatozoa (Tesis). Palu (ID): Universitas Tadulako.
- Fulton JE. 2006. Avian genetic stock preservation: An industry perspective. *Poult Sci* 85: 227-231.
- Froman DF, Kirby JD. 2008. Male Reproduction. Dalam: Hafez ESE, Hafez B, editor. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Willkins. Hlm. 237-242.
- Gerzilov V. 2010. Influence of various cryoprotectants on the sperm mobility of Muscovy semen before and after cryopreservation. *Agric Sci Technol* 2: 57-60.
- Han XF, Niu ZY, Liu FZ, Yang CZ. 2005. Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and *thawing* temperature on cryopreservation of duck semen. *J Poult Sci* 4: 197-201.
- Iskandar SR, Mardalestari R, Hernawati E, Mardiah, Wahyu E. 2006. Pengaruh jenis, konsentrasi krioprotektan dan metode *thawing* terhadap kualitas semen beku ayam Arab. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 11: 34-38.
- Kostaman T, Utama IK. 2006. Studi motilitas dan daya hidup spermatozoa kambing Boer



- pada pengencer tris sitrat-fruktose. *J Sainvet* 24(1): 58-64.
- Makhafola MB, Lehloenya KC, Mphaphathi ML, Dinnyes A, Nedambale TL. 2009. The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *South African J Anim Sci* 39: 242- 245.
- Malik A, Haron AW, Yusoff R, Nesa M, Bukar M, Kasim A. 2013. Evaluation of the ejaculate quality of the red jungle fowl, domestic chicken, and bantam chicken in Malaysia. *J Vet Anim Sci* 37: 564-568.
- Mitchell V, Rives N, Albert M, Peers M, Selva J, Clavier B, Escudier E, Escalier D. 2006. Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Human Reprod* 21: 2065-2074.
- Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. 2008. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand* 50: 1-7.
- Saacke RG. 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 70: 473-478.
- Saleh DM. 2004. Optimization of semen processing and cryopreservation technique in Philippine Native Roosters (*Gallus gallus domesticus* L). (Disertasion). Los Banos: University of the Philippine Los Banos.
- Solihati N, Idi R, Setiawan R, Asmara IY. 2006. Pengaruh lama penyimpanan semen cair ayam buras pada suhu 5°C terhadap periode fertil dan fertilisasi sperma. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(1) :7-11.
- Souhoka DF, Matatula MJ, Mesang-Nalley WM, Rizal M. 2009. Laktosa mempertahankan daya hidup spermatozoa kambing peranakan etawa yang dipreservasi dengan plasma semen domba priangan. *J Veteriner* 10(3): 135-142.
- Suidzinska, A, Lukaszewicz E. 2008. The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. *Anim Sci Pap Rep* 26: 331-340.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. Sumantri B penerjemah, Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama. Hlm. 87-88.
- Tabatabaei S, Baran A, Batavani R, Ayen E. 2011. Effects of vitamin E addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. *J Vet Research Form* 6(2): 103-111.
- Tremellen K. 2008. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Human Reprod* 14: 243-258.
- Valerdi MR, Eftekhari P, Yazdi, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. 2009. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* 26: 347-354.
- Widya A, Kustono, Widayati TA, Bintara S, Ismaya. 2013. Pengaruh dosis sperma yang diencerkan dengan NAACL fisiologis terhadap fertilitas telur pada inseminasi buatan ayam Kampung. *Bul Peternakan* 37(1): 1-5.