

## **Keberhasilan Pembekuan Semen Ayam yang Diencerkan dan Diperkaya dengan Glukosa, Trehalosa, Sukrosa dan Laktosa**

*(FREEZING OF ROOSTERS SEMEN WHICH EXTENDED AND ENRICHED WITH  
GLUCOSE, TREHALOSE, SUCROSE AND LACTOSE)*

**Khaeruddin, Muhammad Erik Kurniawan**

Program Studi Peternakan,  
Sekolah Tinggi Ilmu Pertanian Muhammadiyah,  
Jl. Teuku Umar No.8 Kelurahan Biringere  
Kecamatan Sinjai Utara, Kabupaten Sinjai,  
Sulawesi Selatan, Indonesia. 92611  
Telp./Faks: 0482-21484  
Email: Erukhaeruddin@gmail.com

### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis dan konsentrasi gula yang paling sesuai untuk digunakan dalam pengencer semen pada pembekuan spermatozoa ayam kampung. Semen dikoleksi dari 5 ekor ayam pejantan dengan metode pemijatan. Segera setelah penampungan, semen segar dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen dibagi dibagi ke dalam dua belas tabung. Tiap semen diencerkan dengan pengencer dasar ringer laktat kuning telur yang ditambahkan jenis gula yaitu glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa yang dikombinasikan dengan konsentrasi gula yaitu 20 mM, 50 mM dan 80 mM. Semen cair dikemas dalam mini straw kemudian diekuilibrasikan, dibekukan di atas permukaan nitrogen cair kemudian disimpan dalam kontainer selama 24 jam. Motilitas spermatozoa dievaluasi setelah pengenceran, ekuilibrasikan dan *thawing*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kualitas yang signifikan ( $P>0,05$ ) dengan perlakuan berbagai jenis gula, namun terdapat perbedaan motilitas yang signifikan ( $P<0,05$ ) dengan perbedaan konsentrasi gula. Motilitas spermatozoa terbaik diperoleh pada konsentrasi gula 50 mM dan 80 mM. Motilitas spermatozoa setelah *thawing* 36,56-37,19% dengan konsentrasi gula 50 mM dan 80 mM, sedangkan konsentrasi gula 20 mM hanya menghasilkan motilitas 34,06%. Simpulan penelitian ini adalah glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa dapat ditambahkan ke dalam pengencer semen ayam kampung dengan konsentrasi 50 mM untuk pembekuan.

Kata-kata kunci: jenis gula; konsentrasi gula; semen beku; ayam kampung

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the type and concentration of sugar that was most suitable for use in semen extenders in freezing kampung rooster spermatozoa. Semen was collected from five roosters using massage method. Immediately after collection, the semen was evaluated macroscopically and microscopically. Semen was divided into twelve tubes. Each of them diluted with ringer lactate egg yolk added with various sugar such as glucose, trehalose, sucrose and lactose combined with sugar concentration of 20 mM, 50 mM and 80 mM. Liquid semen was packaged in a mini straw and was equilibrated, semen was frozen above the surface of the liquid nitrogen then it was stored in a container for 24 hours. Spermatozoa motility was evaluated after dilution, equilibration and thawing. The results showed that there were no significant differences in quality ( $P> 0.05$ ) with the treatment of various types of sugars, but there were significant differences in motility ( $P<0.05$ ) with differences in sugar concentrations. The best motility of spermatozoa was obtained at 50 mM and 80 mM sugar concentrations. Spermatozoa motility after thawing was 36.56-37.19% with a sugar concentration of 50 mM and 80 mM, whereas a sugar concentration of 20 mM was only resulting 34.06% of motility. The conclusion of this research is glucose, trehalose, sucrose and lactose can be added to the kampung rooster semen extender with a concentration of 50 mM for freezing.

Keywords: type of sugar; sugar concentration; frozen semen; Kampung rooster

## PENDAHULUAN

Peningkatan popularitas ayam ras di Indonesia sebagai sumber pangan hewani dapat menyebabkan turunnya perhatian terhadap populasi ayam kampung di Indonesia. Masyarakat hingga kini masih belum memahami pentingnya program seleksi dan pemuliaan bibit unggul untuk meningkatkan mutu genetik ternak ayam kampung. Keadaan ini menyebabkan perlunya upaya konservasi bibit unggul ayam buras Indonesia dengan memanfaatkan teknologi yang ada. Teknologi kriopreservasi semen adalah salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk menjamin ketersediaan bibit unggul ayam kampung Indonesia. Kriopreservasi semen merupakan upaya pembekuan semen dengan tujuan mempertahankan daya hidup spermatozoa dalam waktu yang lama.

Bahan pengencer semen merupakan salah satu faktor penting yang menunjang keberlangsungan hidup spermatozoa selama pembekuan. Bahan pengencer tersebut harus mengandung krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa dari efek pembekuan. Menurut Purdy *et al.* (2013) pengencer dan krioprotektan memengaruhi pengaturan fosfolipid dan protein membran sel yang menyebabkan perbedaan motilitas dan Integritas membran plasma spermatozoa ayam selama pembekuan. Gula merupakan zat nutrisi yang lazim ditambahkan ke dalam pengencer semen. Selain berfungsi sebagai krioprotektan, gula juga merupakan sumber energi bagi spermatozoa. Jenis gula yang umum digunakan berasal dari golongan gula sederhana seperti monosakarida dan disakarida. Glukosa dan fruktosa merupakan salah satu contoh monosakarida sedangkan sukrosa, trehalosa, dan laktosa merupakan contoh disakarida.

Berdasarkan laporan Gómez-Fernández *et al.* (2012), penggunaan disakarida lebih efektif daripada monosakarida untuk kriopreservasi semen babi, sedangkan Nynca *et al.* (2016) menyatakan bahwa glukosa, sukrosa atau trehalosa dapat digunakan untuk kriopreservasi semen ikan. Selain itu, trehalosa dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa babi (Malo *et al.*, 2010). Pada semen domba, sukrosa dan trehalosa dapat menurunkan jumlah spermatozoa abnormal (Jafaroghli *et al.*, 2011). Hal senada dikemukakan oleh penelitian Pelufo *et al.* (2015) bahwa trehalosa baik digunakan sebagai pengencer semen domba. Kombinasi glukosa dan trehalosa juga dapat memper-

tahankan karakteristik spermatozoa kambing boer setelah kriopreservasi (Naing *et al.*, 2010).

Perbedaan jenis gula menghasilkan kualitas semen beku yang berbeda-beda pada berbagai spesies hewan. Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa penggunaan berbagai gula sederhana (monosakarida) tidak menghasilkan perbedaan kualitas spermatozoa pada semen cair ayam yang disimpan selama 60 jam (Khaeruddin *et al.*, 2016), namun jenis gula mungkin dapat memengaruhi kualitas spermatozoa ayam setelah dibekukan. Pada penelitian ini dicoba berbagai jenis gula baik monosakarida maupun disakarida pada konsentrasi yang berbeda sebagai pengencer untuk pembekuan semen ayam. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jenis dan konsentrasi gula yang paling sesuai untuk digunakan dalam pengencer pada pembekuan semen ayam kampung.

## METODE PENELITIAN

### Sumber Semen

Semen yang digunakan berasal dari semen lima ekor ayam kampung berumur lebih dari satu tahun yang dipelihara dalam kandang individu berukuran 40 x 50 x 70 cm dan diberikan komplit sebanyak 150 gr/ekor/hari.

### Penyiapan Pengencer

Bahan pengencer dibuat dengan menggunakan pengencer dasar ringer laktat (PT. Widatra Bakti) dengan kuning telur itik 15%. Ringer laktat kuning telur dihomogenkan kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan digunakan sebagai pengencer dasar yang dibagi ke dalam 12 tabung sesuai perlakuan, kemudian ditambahkan berbagai jenis dan konsentrasi gula. Berdasarkan metode yang dilakukan oleh Junaedi *et al.* (2016), masing-masing pengencer ditambahkan *dimethyl sulfoxide* 7%, *penicillin* 1000 IU/mL dan *streptomycin* 1 mg/mL. Tingkat keasaman (pH) pengencer diatur dengan menggunakan *tris hydroxymethyl aminomethane* (Merck) untuk mendapatkan pH 7.

### Koleksi Semen, Pengenceran Semen dan Pengemasan Semen

Koleksi semen dilakukan dengan metode pemijatan pada bagian kloaka hingga terjadi ejakulasi. Semen yang telah dikoleksi dibagi ke dalam 12 tabung yang berisi pengencer sesuai

perlakuan. Semen yang telah diencerkan dikemas ke dalam *mini straw* (IMV, France) dan disusun dalam rak pembekuan.

### Ekuilibrasi, Pembekuan dan Penyimpanan Semen

Semen dalam mini straw diekuilibrasi pada suhu 5 °C selama dua jam (Santiago-Moreno *et al.*, 2011), dibekukan pada uap nitrogen cair sejauh 3 cm dari permukaan nitrogen cair (Madeddu *et al.*, 2016) selama 10 menit (Mosca *et al.*, 2016), kemudian disimpan pada kontainer nitrogen cair (-196 °C) selama 24 jam. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pertanian Terpadu Sekolah Tinggi Ilmu Pertanian (STIP) Muhammadiyah Sinjai.

### Thawing Semen dan Evaluasi Semen

*Thawing* semen dilakukan dengan memasukkan *straw* dalam penangas air atau *waterbath* dengan suhu air 37°C selama 30 detik. Semen segar dievaluasi secara makroskopis (volume, pH, warna dan kekentalan) dan evaluasi mikroskopis (konsentrasi, gerakan massa, motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa). Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *Neubauer chamber* dan mikroskop. Gerakan massa dinilai menggunakan pembesaran lensa 10 x 10, dengan kriteria sangat baik (+++), baik (++), cukup baik (+), dan buruk (0). Motilitas spermatozoa diamati menggunakan mikroskop pembesaran 10 x 40, dengan membandingkan spermatozoa hidup bergerak ke depan (progresif) dengan yang tidak progresif, nilai diberikan dari angka 0% (mati semua) hingga 100% (motil semua). Persentase spermatozoa hidup (viabilitas) dan abnormalitas diamati dengan menggunakan pewarna eosin-negrosin, pemeriksaan dilakukan dengan pembesaran 10 x 40. Pengamatan motilitas spermatozoa juga dilakukan setelah pengenceran, ekuilibrasi dan *thawing*. *Recovery rate* (RR) persentase spermatozoa yang pulih kembali setelah pembekuan dihitung dengan rumus,  $recovery\ rate = [(motilitas\ spermatozoa\ setelah\ thawing) \times (motilitas\ spermatozoa\ semen\ segar)^{-1}] \times 100\%$ .

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dengan faktor pertama adalah perlakuan jenis gula (glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa) dan faktor kedua adalah konsentrasi gula (20 mM, 50 mM dan 80 mM), pengambilan data diulang sebanyak empat

kali (koleksi semen). Data dianalisis dengan sidik ragam (Anova), dan data yang ditemukan adanya pengaruh perlakuan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Segar Ayam Kampung

Semen segar yang diperoleh dari lima ekor ayam kampung memiliki volume rata-rata 0,20±0,05 mL lebih tinggi dari penelitian sebelumnya yaitu 0.16 mL (Khaeruddin *et al.*, 2016) dan 0,19 mL (Murcahyana *et al.*, 2016). Namun, lebih rendah dari yang didapatkan Lubis (2011) yaitu 0,75 mL dan Ulus *et al.* (2019) yaitu 0,47 mL. Semen yang dihasilkan berwarna putih susu dengan konsistensi kental menggambarkan tingginya konsentrasi spermatozoa. Tingkat keasaman (pH) semen yang didapatkan rata-rata 7,4 mendekati nilai yang didapatkan Lubis (2011) yaitu 7,5.

Konsentrasi spermatozoa yang didapatkan pada penelitian ini rata-rata 3,08±1,05 miliar/mL dengan rata-rata 630 juta dihasilkan dalam sekali ejakulasi. Hasil ini lebih tinggi dari yang didapatkan sebelumnya yaitu 1,60 miliar/ mL (Lubis, 2011), 1,37 miliar/ mL (Ulus *et al.*, 2019) dan 2,46 miliar/ mL (Murcahyana *et al.*, 2016).

Gerakan massa spermatozoa tergolong gelombang massa tebal dan cepat berpindah tempat (+++), sedangkan rata-rata motilitas pada penelitian ini 87,00±9,75% lebih tinggi dari yang didapatkan sebelumnya 83,7% (Murcahyana *et al.*, 2016), 82,09% (Khaeruddin *et al.*, 2016) dan 77,57% (Lubis, 2011). Viabilitas yang didapatkan pada penelitian ini (93,28±8,86%) juga lebih tinggi dari yang dilaporkan Lubis (2011) dan Murcahyana *et al.* (2016) yang masing-masing mendapatkan 83,7% dan 85,3%. Rata-rata abnormalitas yang didapatkan 9,09±6,28 % lebih tinggi dari laporan sebelumnya yaitu 1,3% (Ulus *et al.*, 2009) dan 8,70% (Murcahyana *et al.*, 2016).

Perbedaan kualitas spermatozoa ayam pada berbagai penelitian dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti suhu lingkungan (Santiago-Moreno *et al.*, 2009; Shanmugam *et al.*, 2014), frekuensi penampungan semen (Saridewi *et al.*, 2018), umur ayam pejantan (Tabatabaei *et al.*, 2010; Shanmugam *et al.*, 2014) dan kandungan ransum ayam pejantan (Mustafa *et al.*, 2017; Safari *et al.*, 2018)

Tabel 1. Rata-rata karakteristik semen segar 5 ekor ayam kampung

Parameter	Rerata ± SD
Volume semen (ml)	0,2±0,05
Warna semen	Putih susu
Kekentalan semen	Kental
pH semen	7,4±0,55
Konsentrasi spermatozoa per ml (x10 <sup>9</sup> )	3,08±1,05
Konsentrasi spermatozoa per ejakulat (x10 <sup>9</sup> )	0,63±0,33
Gerakan massa spermatozoa	++/+++
Motilitas spermatozoa (%)	87,00±9,75
Viabilitas spermatozoa (%)	93,28±8,86
Abnormalitas spermatozoa (%)	9,09±6,28

### Jenis Gula terhadap Motilitas dan Recovery Rate Spermatozoa

Hasil penelitian (Tabel 2) menunjukkan bahwa perlakuan berbagai jenis gula tidak berpengaruh ( $P>0,05$ ) terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung setelah pengenceran, ekuilibrasi dan *thawing*. Nilai RR yang dihasilkan juga tidak berbeda ( $P>0,05$ ) dengan perlakuan berbagai jenis gula (Tabel 3). Keempat jenis gula dapat digunakan dengan baik sebagai pengencer semen beku ayam kampung karena tidak menghasilkan perbedaan motilitas spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan kualitas spermatozoa yang dibekukan menggunakan penambahan sukrosa dengan trehalosa pada spermatozoa kambing (Naing *et al.*, 2010) dan spermatozoa domba (Uçan *et al.*, 2016).

Penelitian lain menyatakan bahwa penggunaan laktosa dan trehalosa tidak menghasilkan perbedaan kecepatan motilitas spermatozoa ikan *sturgeon* (Golshahi *et al.*, 2018), sedangkan penambahan trehalosa dan laktosa pada pengencer yang mengandung gliserol tidak menyebabkan perbedaan motilitas spermatozoa babi setelah *thawing* (Silva *et al.*, 2015). Penggunaan glukosa, sukrosa atau trehalosa tidak menghasilkan perbedaan motilitas spermatozoa pada kriopreservasi semen ikan *trout* (Nynca *et al.*, 2011), serta penggunaan laktosa, sukrosa dan glukosa tidak menyebabkan perbedaan motilitas progresif spermatozoa ikan mas setelah *thawing* (Bozkurt *et al.*, 2016). Penelitian Blanco *et al.* (2011) menunjukkan bahwa penambahan sukrosa maupun kombinasi sukrosa dengan trehalosa meningkatkan motilitas spermatozoa burung

*crane* setelah *thawing* (20–26%), dan penambahan sukrosa mampu mempertahankan motilitas spermatozoa kalkun.

Kualitas spermatozoa yang rendah setelah *thawing* disebabkan oleh perubahan suhu mendadak, pembentukan es dan tekanan osmotik (Hezavehei *et al.*, 2018). Blesbois (2012) menyatakan bahwa selama pembekuan, sel-sel mengalami pengurangan volume karena dehidrasi dan pengaruh krioprotektan internal. Pada proses *thawing*, terjadi pembengkakan spermatozoa akibat rehidrasi dan pengeluaran krioprotektan dari fraksi intraseluler, dan peningkatan sementara ukuran partikel es intraseluler menginduksi ketegangan yang sangat tinggi pada membran sel. Membran nukleus dapat bertahan cukup baik, tetapi membran mitokondria dan membran plasma sangat peka terhadap stres fisik ini. Cedera membran yang terjadi selama proses pembekuan menyebabkan kematian spermatozoa mencapai lebih dari 50%. Proses pembekuan menyebabkan terjadinya pengerasan membran, kerusakan metabolisme dengan perubahan mobilitas dan penurunan *adenosine triphosphate* serta perubahan dalam glikokaliks membran plasma (Long, 2006; Blesbois *et al.*, 2008; Pelaez dan Long, 2008).

Penambahan gula dalam pengencer dapat membantu mempertahankan kualitas spermatozoa selama pembekuan. Gula berperan sebagai krioprotektif yang berinteraksi dengan lipid dan protein membran serta mengurangi risiko pembentukan kristal es intraseluler yang menyebabkan dehidrasi osmotik seluler selama kriopreservasi (Agca *et al.*, 2002).

Monosakarida dan disakarida tidak dapat berdifusi melalui membran, dan diyakini bahwa efek krioprotektif dilakukan dengan membuat

Tabel 2. Motilitas spermatozoa ayam kampung (%) sebelum dan setelah pembekuan dengan berbagai jenis dan konsentrasi gula dalam pengencer ringer laktat kuning telur (Rerata±SD)

Tahap pembekuan	Jenis gula	Konsentrasi gula			Rata-rata
		20 mM	50 mM	80 mM	
Setelah pengenceran	Glukosa	85,00±4,08	90,00±4,08	91,25±4,79	88,75
	Trehalosa	85,00±0,00	88,75±4,79	90,00±4,08	87,92
	Sukrosa	86,25±2,50	88,75±2,50	90,00±4,08	88,33
	Laktosa	83,75±2,50	88,75±4,79	90,00±4,08	87,50
	Rata-rata	85,00 <sup>a</sup>	89,06 <sup>b</sup>	90,31 <sup>b</sup>	
Setelah ekuilibrase	Glukosa	80,00±0,00	81,25±2,50	85,00±4,08	82,08
	Trehalosa	77,50±2,89	81,25±2,50	82,50±2,89	80,42
	Sukrosa	81,25±2,50	81,25±4,79	82,50±2,89	81,67
	Laktosa	77,50±2,89	81,25±4,79	81,25±4,79	80,00
	Rata-rata	76,06 <sup>A</sup>	81,25 <sup>B</sup>	82,81 <sup>B</sup>	
Setelah thawing	Glukosa	36,25±2,50	37,50±2,89	37,50±2,89	37,08
	Trehalosa	33,75±2,50	36,25±2,50	38,75±4,79	35,42
	Sukrosa	31,25±4,79	36,25±2,50	37,50±2,89	35,00
	Laktosa	35,00±4,08	36,25±2,50	35,00±4,08	36,25
	Rata-rata	34,06 <sup>A</sup>	36,56 <sup>B</sup>	37,19 <sup>B</sup>	

Keterangan: Superskrip dengan huruf kecil yang mengikuti angka pada baris yang sama menyatakan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01). Superskrip dengan huruf kapital yang mengikuti angka pada baris yang sama menyatakan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Tabel 3. Recovery rate (RR) spermatozoa ayam kampung (%) dengan berbagai jenis dan konsentrasi gula dalam pengencer ringer laktat kuning telur (Rerata±SD)

Jenis karbohidrat	Level karbohidrat			Rata-rata
	20 mM	50 mM	80 mM	
Glukosa	39,76±3,26	41,08±2,70	41,08±2,70	40,64
Trehalosa	36,99±2,62	39,76±3,26	32,40±4,22	39,72
Sukrosa	34,36±5,96	39,69±1,61	41,08±2,70	38,38
Laktosa	38,45±5,27	39,76±3,26	38,45±5,27	38,89
Rata-rata	37,39 <sup>a</sup>	40,08 <sup>b</sup>	40,75 <sup>b</sup>	

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menyatakan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01).

sebuah tekanan osmotik yang menginduksi dehidrasi sel dan mengurangi insiden pembentukan es intraseluler (Fuller, 2004). Ditambahkan oleh Pelufo *et al.* (2015) bahwa disakarida seperti sukrosa dan trehalosa merupakan krioprotektan non-penetrasi yang meningkatkan tekanan osmotik cairan ekstraseluler sehingga dapat menarik air keluar dari sel spermatozoa, menurunkan risiko pembentukan kristal es dan kerusakan fisik. Selain itu, trehalose berperan secara tidak

langsung terhadap aktivitas antioksidan dengan meningkatkan level glutathione dan mengurangi tingkat lipid peroksida (Aisen *et al.*, 2005).

Rata-rata motilitas spermatozoa setelah pengenceran berada pada kisaran 87,50-88,75% lebih tinggi dari laporan penelitian sebelumnya yaitu 63% pada spermatozoa ayam menggunakan krioprotektan *dimethylacetamide* (DMA) (Raynardia, 2017). Pada saat setelah ekuilibrase, rata-rata motilitas spermatozoa yang didapatkan

pada penelitian ini berada pada kisaran 80-82,08% juga lebih tinggi dari yang didapatkan Junaedi *et al.* (2016) yaitu 73,89% menggunakan krioprotektan *dimethyl sulfoxide* dan Raynardia (2017) yang mendapatkan motilitas 70%.

Rata-rata motilitas spermatozoa yang didapatkan setelah *thawing* yaitu 35-37,08%, hampir sama dengan motilitas pada laporan penelitian-penelitian sebelumnya, yaitu 38,6% menggunakan pengencer *Beltville poultry semen extender* (BPSE) yang ditambahkan asam hialuronat (Lotfi *et al.*, 2017), 38% menggunakan pengencer BPSE dengan krioprotektan DMA (Laura *et al.*, 2017), 37,22% menggunakan pengencer ringer laktat kuning telur dengan krioprotektan DMSO (Junaedi *et al.*, 2016), dan 35,8% menggunakan pengencer BPSE yang ditambahkan L-karnitin (Fattah *et al.*, 2017). Hasil yang didapatkan pada penelitian ini bahkan lebih tinggi dari yang didapatkan Shahverdi *et al.* (2015) yaitu 22,7% menggunakan pengencer BPSE dan Kumar *et al.* (2018) yang mendapatkan 27,73-34,55% menggunakan pengencer ditambahkan N-metil asetamida.

### **Konsentrasi Gula terhadap Motilitas dan Recovery Rate Spermatozoa**

Penambahan berbagai konsentrasi gula pada pengencer memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) pada motilitas spermatozoa setelah pengenceran, dan berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) pada motilitas spermatozoa setelah ekuilibrisasi dan *thawing* (Tabel 2), demikian juga dengan nilai RR (Tabel 3). Interaksi antara jenis gula dan konsentrasi gula tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap motilitas spermatozoa dan nilai RR. Konsentrasi gula 50-80 mM dalam pengencer merupakan perlakuan terbaik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa ayam jika dibandingkan dengan konsentrasi gula 20 mM. Peningkatan konsentrasi gula cenderung meningkatkan motilitas spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Koshimoto dan Mazur (2002) bahwa kemampuan proteksi gula meningkat berdasarkan peningkatan konsentrasinya menyebabkan osmolaritas di bawah 500 mOsm

Hasil ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya, yaitu penambahan trehalosa dengan konsentrasi 50 mM menghasilkan kualitas spermatozoa lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 25 mM pada pembekuan semen rusa angora (Tuncer *et al.*, 2013). Penggunaan sukrosa 100 mM menghasilkan

gerakan spermatozoa terbaik jika dibandingkan 50 mM pada semen beku kuda (Consuegra *et al.*, 2018). Profil aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) lebih tinggi pada spermatozoa kerbau menggunakan pengencer yang ditambahkan trehalosa 30, 45 dan 60 mM jika dibandingkan konsentrasi 15 mM setelah *thawing*, motilitas yang dihasilkan pun lebih tinggi pada penggunaan konsentrasi trehalosa 30 mM jika dibandingkan dengan konsentrasi 15 mM (Iqbal *et al.*, 2016). Penelitian Pérez-Marín *et al.* (2018) menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi trehalosa 0,15 M menghasilkan motilitas progresif terbaik jika dibandingkan dengan konsentrasi 0,5 dan 0,3 M pada spermatozoa kuda setelah vitrifikasi.

Rata-rata motilitas terbaik setelah *thawing* yang didapatkan pada penelitian ini yaitu 36,56-37,19% lebih tinggi dari hasil yang dilaporkan Mosca *et al.* (2016) yaitu 29,1% menggunakan pengencer trehalosa 100 mM pada spermatozoa ayam lohman. Namun, hampir sama dengan yang didapatkan Silva *et al.* (2015) yaitu dengan penambahan trehalosa dan laktosa menghasilkan motilitas spermatozoa babi pasca *thawing* masing-masing 36,11 % dan 37,22%. Nilai rata-rata RR tertinggi pada penelitian ini adalah 40,08-40,75% lebih tinggi dari laporan sebelumnya yaitu 36% menggunakan trehalosa 100 mM pada spermatozoa ayam lohman (Mosca *et al.*, 2016).

Pelugo *et al.* (2015) menyatakan bahwa kehadiran trehalosa dan sukrosa selama proses pembekuan meningkatkan viabilitas spermatozoa, integritas membran plasma pada daerah akrosomal dan post akrosomal, integritas akrosom pada segmen anterior dan integritas membran plasma pada bagian intermedial spermatozoa domba. Hasil penelitian El-Shesh-tawy *et al.* (2015) menunjukkan peningkatan motilitas, viabilitas, integritas akrosom, integritas membran plasma dan penurunan abnormalitas, pertahanan status DNA spermatozoa dengan penambahan trehalosa atau sukrosa berkonsentrasi 50 atau 100 mM/L pada semen sapi.

Menurut Aboagla dan Terada (2003), penambahan trehalosa berkonsentrasi tinggi pada pengencer spermatozoa memberikan perlindungan terbaik pada parameter motilitas *post-thaw*, *recovery rate*, resisten termal, dan integritas akrosom. Disakarida ini meningkatkan fluiditas membran sebelum pembekuan yang menyebabkan spermatozoa tahan terhadap efek pembekuan dan *thawing*.

## SIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa dapat ditambahkan ke dalam pengencer semen dengan konsentrasi 50 mM untuk pembekuan spermatozoa ayam kampung.

## SARAN

Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh penggunaan gula dalam pengencer semen ayam dengan konsentrasi di atas 80 mM.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana Penelitian Kompetitif Nasional dalam Skema Penelitian Dosen Pemula dengan nomor kontrak 115/SP2H/LT/DRPM/2019;1511/L9/AK/2019;051/II.3.AU/A/2019

## DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EM, Terada T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 69: 1245-1250.
- Agca Y, Gilmore J, Byers M, Woods EJ, Liu J, Critser JK. 2002. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biol Reprod* 67:1493-1501.
- Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morillo H, Venturino A. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50: 239-249.
- Blanco JM, Long JA, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM. 2011. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 123: 242-248.
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. 2008. Predictors of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69: 252-261.
- Blesbois E. 2012. Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. *J Poult Sci* 49: 141-149.
- Bozkurt Y, Yava<sup>o</sup> í, Yildiz C. 2016. Effect of extender supplemented with different sugar types on post-thaw motility, viability and fertilizing ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Isr J Aquacult-Bamid* 68: 1-7.
- Consuegra C, Crespo F, Bottrel M, Ortiz I, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Pereira B, Hidalgo M. 2018. Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Anim Reprod Sci* 191: 85-91.
- El-Sheshtawy RI, Sisy GA, El-Nattat WS. 2015. Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the postthawing quality of cattle bull semen. *Asian Pac J Reprod* 4(1): 26-31.
- Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, Esmaeili V, Najafi A. 2017. L-carnitine in rooster semen cryopreservation: flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology* 74: 148-153.
- Fuller BJ. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 25: 375-388.
- Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, Mocé E, de Mercado E. 2012. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 133: 109-116.
- Golshahi K, Aramli MS, Nazari RM, Habibi E. 2018. Disaccharide supplementation of extenders is an effective means improving the cryopreservation of semen in sturgeon. *Aquaculture* 486: 261-265.
- Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. 2018. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online* 37(3): 327-339.

- Iqbal S, Andrabi SMH, Riaz A, Durrani AZ, Ahmad N. 2016. Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nili Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 85(5): 954-959.
- Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Res* 96(1) : 58-63.
- Junaedi, Arifiantini RA, Sumantri C, Gunawan A. 2016. Penggunaan *dimethyl sulfoxide* sebagai krioprotektan dalam pembekuan semen ayam kampung. *J Veteriner* 17(2) : 300-308.
- Khaeruddin, Arifiantini, RI, Sumantri C, Darwati S. 2016. Kualitas spermatozoa ayam peranakan sentul dalam pengencer ringer laktat kuning telur dengan berbagai monosakarida. *J Ked Hewan* 10 (2) : 166-169.
- Koshimoto C, Mazur P. 2002. The effect of the osmolality of sugarcontaining media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology* 45: 80–90.
- Kumar P, Swathi B, Shanmugam M. 2018. Cryopreservation of rooster semen using N-methylacetamide as cryoprotective agent. *Int J Agr Sci* 10(3): 5123-5126.
- Laura Y, Harimurti S, Ismaya. 2017. Effect of different levels of dimethylacetamide (DMA) on sperm quality of bangkok rooster chicken and sperm survivability in reproductive tract of hen. *Pak J Nutr* 16(3): 144-147.
- Long JA. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poult Sci* 85: 232-236.
- Lotfi S, Mehri M, Sharafi M, Masoudi R. 2017. Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Anim Reprod Sci* 184: 204-210.
- Lubis TM. 2011. Motilitas spermatozoa ayam kampung dalam pengencer air kelapa, NaCl fisiologis dan air kelapa-NaCl fisiologis pada 25-29 °C. *Agripet* 11(2): 45-50.
- Madeddu M, Mosca F, Abdel Sayed A, Zaniboni L, Mangiagalli MG, Colombo E, Cerolini S. 2016. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Anim Reprod Sci.* 171:58-64.
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, de Blas I, Espinosa E. 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* 61: 17–21.
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini C. 2016. Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm. *Data Brief* 9: 1118–1121.
- Murcahyana, Susilawati T, Isnaini N. 2016. Pengaruh pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dalam larutan natrium klorida fisiologis sebagai bahan pengencer semen terhadap peningkatan kualitas spermatozoa ayam buras pada suhu ruang. *J Ked Hewan* 10 (2): 175-180.
- Mustafa, Dasrul, Yaman MA, Wahyuni S dan Sabri M. 2017. Pengaruh pemberian kombinasi pakan fermentasi dengan multi enzim dan vitamin E dalam ransum terhadap peningkatan kualitas semen ayam Arab. *Agripet* 17(1) : 43-52.
- Naing SW, Wahid H, Azam KM, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of sugars on characteristic of boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 122: 23-28.
- Nynca J, Judycka S, Liszewska E, Dobosz S, Grudniewska J, Arai K, Fujimoto T, Ciereszko A. 2016. Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from Salmonidae species. *Aquaculture* 464: 340-348.
- Pelaez J, Long JA. 2008. Characterizing the glycocalyx of poultry semen: II Invitro storage of turkey semen and mobility phenotype affects the carbohydrate component of sperm membrane glycoconjugates. *J Androl* 29: 431-439.



- Pelugo V, Armengol MFL, Malcotti V, Venturino A, Aisen EG. 2015. Effects of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of cryopreserved ram sperm. *Theriogenology* 83: 144-151.
- Pérez-Marín, Requena FD, Arando A, Ortiz-Villalón S, Requena F, Agüera EI. 2018. Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology* 80: 62-69.
- Purdy PH, Spiller SF, Blackburn HD. 2013. Rooster sperm plasma membrane protein and phospholipid organization and reorganization attributed to cooling and cryopreservation. *Cryobiology* 67 (3): 406.
- Raynardia YL. 2017. Pengaruh perbedaan level krioprotektan DMA terhadap pembekuan sperma ayam. *Journal of Livestock Science and Production* 1(1): 18-23.
- Safari AR, Shariatmadari F, Sharafi M, Karimi TMA, Shahverdi A. 2018. Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Ross breeder roosters fed a diet supplemented with a moderate ratio of n-3: n-6 fatty acids. *Poult Sci* 97(11): 4113-4121.
- Santiago-Moreno J, Castaño C, Coloma MA, Gomez-Brunet A, Toledano-Diaz A, López-Sebastián A, Campo JL. 2009. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. *Poult Sci* 88: 2661-2669.
- Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, Campo JL. 2011. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poult Sci* 90: 2047–2053.
- Saridewi IGAM, Budiasa MK, Trilaksana IGNB. 2018. Pengaruh frekuensi penampungan semen terhadap volume, konsentrasi dan motilitas spermatozoa ayam pelung. *Indonesia Medicus Veterinus* 7(5): 461-465.
- Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Yekta AA, Esmaeili V, Sharbatoghli M, Janzamin E, Hajnasrollahi M, Mostafayi F. 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology* 83(1): 78-85.
- Shanmugam M, Vinoth A, Rajaravindra KS, Rajkumar U. 2014. Evaluation of semen quality in roosters of different age during hot climatic condition. *Anim Reprod Sci* 145(1-2):81-5.
- Silva CG, Cunha ER, Blume GR, Malaquias JV, Bão SN, Martins CF. 2015. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology* 70: 90–94.
- Tabatabaei S, Chaji M, Mohammadabadi T. 2010. Correlation between age of rooster and semen quality in Iranian Indigenous broiler breeder chickens. *J Anim Vet Adv* 9(1): 195-198.
- Tuncer PB, Ta°demir U, Büyükleblebici S, Özgürta° T, Co°kun E, Erol H, Aydin FN, Gürcan IS. 2013. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen-thawed Angora buck semen. *Small Ruminant Res* 113(2-3): 383-389.
- Uçan U, Küçük N, Ahmad E, Naseer Z, Aksoy M, Serin I, Ceylan A. 2016. Effect of different sugars supplemented to the extender in combination with cholesterol loaded cyclodextrin (CLC) on post-thaw quality of ram spermatozoa. *Small Ruminant Res* 136: 243-246.
- Ulus E, Kusumawati EK, Nugroho KT. 2019. Pengaruh pengencer dan lama simpan semen ayam kampung pada suhu ruang terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa. *Jurnal Sains Peternakan* 7(1): 29-40.