

**PEMBEKUAN SPERMATOZOA AYAM KAMPUNG DENGAN  
SUPLEMENTASI BOVINE SERUM ALBUMIN DAN PUTIH TELUR  
DALAM PENGECER RINGER LAKTAT KUNING TELUR**

*Freezing of Kampung Roosters Spermatozoa with Egg White and Bovine Serum  
Albumin in Ringer Lactate Egg Yolk*

Khaeruddin<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Peternakan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Muhammadiyah  
Sinjai, Jalan Teuku Umar No.8, Biringere, Sinjai Utara, Indonesia, 92615

\*Corresponding author: Erukhaeruddin@gmail.com

Submitted 2 August 2020, Accepted 1 September 2020

**ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi sumber protein (*bovine serum albumin*/BSA atau putih telur) terbaik sebagai bahan pengencer dalam pembekuan semen ayam kampung. Pengencer dasar yang digunakan adalah ringer laktat dan kuning telur 10% dengan perlakuan kontrol, BSA 0.5%, BSA 1%, BSA 1.5%, putih telur 0.5%, putih telur 1% dan putih telur 1.5%. Semen diencerkan dan dikemas dalam straw 0.25 mL, dilanjutkan dengan ekuilibrasasi pada suhu 5 °C selama 2 jam, ditempatkan pada uap nitrogen cair selama 10 menit dan disimpan dalam container nitrogen cair bersuhu -196 °C selama 24 jam. *Thawing* dilakukan pada suhu 37 °C selama 30 detik. Parameter yang diamati adalah motilitas, viabilitas dan abnormalitas setelah pengenceran dan setelah *thawing*, *recovery rate* dan motilitas spermatozoa 7 jam pada penyimpanan 5 °C setelah *thawing*. Data dianalisis sidik ragam, jika ditemukan pengaruh perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan tidak berpengaruh ( $P>0.05$ ) terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas spermatozoa setelah pengenceran. Demikian juga dengan motilitas dan abnormalitas setelah *thawing*. Perlakuan jenis protein dalam pengencer berpengaruh sangat nyata ( $P<0.01$ ) terhadap motilitas spermatozoa setelah *thawing* yang disimpan selama 7 jam pada suhu 5 °C. Viabilitas spermatozoa setelah *thawing* berbeda ( $P<0.05$ ) antar perlakuan. Viabilitas spermatozoa paling tinggi diperoleh pada pengenceran dengan putih telur 1.5% yaitu 44.33%). Kesimpulan penelitian ini adalah putih telur 1.5% merupakan sumber protein terbaik untuk disuplementasi ke dalam ringer laktat kuning telur sebagai pengencer pada pembekuan semen ayam kampung.

**Kata kunci:** BSA, putih telur, pengencer semen, ayam kampung

---

*How to cite :* Khaeruddin. (2020). Pembekuan Spermatozoa Ayam Kampung dengan Suplementasi Bovine Serum Albumin dan Putih Telur Dalam Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production* Vol 21, No 2 (111-222)

### ABSTRACT

*The aim of this study was to determine the best protein source (bovine serum albumin/BSA or egg white) as diluent at freezing of kampung chicken semen. The basic diluents used were Ringer lactate and egg yolk 10% with control treatment, BSA 0.5%, BSA 1%, BSA 1.5%, egg white 0.5%, egg white 1% and egg white 1.5%. Semen was diluted and packaged in 0.25 mL straws, followed by equilibration at 5 °C for 2 hours, placed in liquid nitrogen vapor for 10 minutes and stored in liquid nitrogen containers at -196 °C for 24 hours. Thawing was carried out at 37 °C for 30 seconds. The parameters observed were motility, viability and abnormalities after dilution and post thawing, recovery rate and motility of spermatozoa at 7 hours at 5 °C storage post thawing. The data were analyzed for variance, if it was found that the effect of the treatment was continued with Duncan's multiple range test. The results showed that the treatment had no effect ( $P > 0.05$ ) on the motility, viability, and abnormalities of spermatozoa after dilution. Likewise, motility and abnormalities post thawing. Treatment of the type of protein in the diluent had a very significant effect ( $P < 0.01$ ) on the motility of spermatozoa after thawing which was stored for 7 hours at 5 °C. The viability of spermatozoa after thawing was different ( $P < 0.05$ ) between treatments. The highest spermatozoa viability was obtained at dilution with 1.5% egg white, namely 44.33%. The conclusion of this study is that 1.5% egg white is the best source of protein to be supplemented in Ringer lactate egg yolk as a diluent in freezing chicken semen.*

**Keywords:** BSA, egg white, semen diluents, Kampung chicken

### PENDAHULUAN

Peningkatan populasi ayam asli Indonesia perlu dilakukan sebagai upaya peningkatan bahan pangan sumber protein hewani. Upaya konservasi plasma nutfah ayam asli Indonesia perlu dilakukan untuk menjamin kelestariannya, upaya tersebut tidak dapat terlepas dari adanya penerapan teknologi. Pembekuan semen merupakan salah satu teknologi yang menjadi terobosan dalam konservasi semen ayam-ayam asli Indonesia.

Komposisi bahan pengencer semen adalah faktor penting dalam mencapai keberhasilan pembekuan semen. Berbagai penelitian terus dilakukan untuk mendapatkan komposisi pengencer yang tepat dan dapat mempertahankan kualitas spermatozoa hingga setelah pencairan kembali (*thawing*). Ringer laktat merupakan cairan isotonis yang telah secara intensif dijadikan pengencer semen ayam pada penelitian sebelumnya (Nugroho dan Saleh, 2016; Fitriyah *et al.*, 2019; Isnaeni *et al.*, 2019; Pratiwi *et al.*, 2019; Inggriani *et al.*, 2020). Kuning telur juga telah banyak

diteliti sebagai bahan tambahan pengencer semen untuk mempertahankan kualitas spermatozoa ayam selama penyimpanan pada suhu ruang maupun pada suhu 3-5 °C (Indrawati *et al.*, 2013; Magfira *et al.*, 2017; Widiastuti *et al.*, 2018; Pratiwi *et al.*, 2019; Santoso *et al.*, 2020). Kualitas spermatozoa yang dibekukan pada suhu -196 °C dapat mengalami penurunan tajam apabila dalam pengencer tidak dilengkapi dengan krioprotektan yang berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari efek pembekuan.

Jenis krioprotektan berdasarkan cara kerjanya dibedakan atas dua yaitu krioprotektan yang bekerja di dalam sel (intraseluler) dan krioprotektan ekstraseluler. Penelitian mengenai pengaruh penggunaan krioprotektan ekstraseluler terhadap kualitas spermatozoa ayam asli Indonesia masih sangat jarang dilakukan, padahal keberadaannya dalam pengencer cukup penting untuk melindungi membran sel spermatozoa. Bovine serum albumin (BSA) merupakan salah satu jenis krioprotektan ekstraseluler yang umumnya

telah diteliti pada semen mamalia. BSA ditambahkan ke pengencer dalam pembekuan sebagai stabilisator membran untuk mengoptimalkan kriopreservasi sel (Sandal *et al.*, 2020). Selain itu, BSA dilaporkan memiliki kemampuan sebagai antioksidan. BSA dapat menghambat peroksidasi lipid pada membran plasma (Azawi dan Hussein, 2016). Menurut Cabrita *et al.* (2001), perlindungan membran terbaik dalam hal ketahanan terhadap *hypoosmotik shock* dapat dicapai ketika BSA dan kuning telur ditambahkan ke dalam pengencer semen. Hasil penelitian Fardin *et al.* (2010) menunjukkan bahwa BSA dalam pengencer semen mampu meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa domba setelah *thawing*. Suplementasi pengencer semen dengan BSA 10 mg/ml meningkatkan motilitas, integritas membran dan viabilitas spermatozoa kuda setelah *thawing* (Ghallab *et al.*, 2017).

Suplementasi BSA dan susu skim meningkatkan motilitas, kadar ATP, aktivitas GAPDH, dan potensi membran mitokondria spermatozoa babi (Fu *et al.*, 2017). Sedangkan hasil penelitian Saleh dan Morteza (2016), menunjukkan bahwa BSA meningkatkan motilitas dan fertilitas spermatozoa ayam yang disimpan 24 jam pada suhu 4 °C. Putih telur kemungkinan dapat dijadikan alternatif pengganti BSA dalam pengencer semen ayam. Hal ini sebagaimana pada semen sapi yang telah dikemukakan oleh Susilawati *et al.* (2016) dan Sholikah *et al.* (2016). Penelitian pembekuan semen ayam asli Indonesia khususnya ayam kampung menggunakan pengencer yang mengandung BSA dan putih telur belum pernah dilakukan. Oleh sebab itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan menentukan konsentrasi sumber protein (BSA atau putih telur) terbaik dalam pengencer semen pada pembekuan ayam kampung.

## MATERI DAN METODE

### Pemeliharaan Ayam

Sumber semen berasal dari ayam kampung jantan sebanyak 3 ekor berumur  $\pm$  20 bulan. Ayam dipelihara dalam kandang individu berukuran 40 x 50 x 70 cm diberi ransum komplit 150 gr ekor<sup>-1</sup> per hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

### Penyiapan pengencer

Pengencer dasar terbuat dari ringer laktat (PT. Widatra Bakti, Indonesia) ditambahkan kuning telur ayam 10% (RLKT) yang disentrifius dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Supernatan digunakan sebagai pengencer dasar ditambahkan 1000 IU mL<sup>-1</sup> penicillin (PT. Meiji Indonesian) dan 1 mg mL<sup>-1</sup> streptomycin (PT. Meiji Indonesian). Pengencer ditambahkan 80 mM glukosa (Merck, KgaA, Darmstadt Germany) dan 7% *dimethyl sulfoxide* (Merck, KgaA, Darmstadt Germany), kemudian distirer selama 5 menit. Selanjutnya, pengencer tersebut dibagi dalam 7 tabung dengan perlakuan penambahan BSA (Glory Diagnostics) dan putih telur ayam ras. Susunan perlakuan yaitu kontrol (pengencer dasar), pengencer dasar + BSA 0.5%, pengencer dasar + BSA 1%, pengencer dasar + BSA 1.5%, pengencer dasar + putih telur 0.5%, pengencer dasar + putih telur 1% dan pengencer dasar + putih telur 1.5%

### Koleksi Semen, Pembekuan Semen dan Thawing

Semen dikoleksi pada pagi hari pukul 07.30 menggunakan teknik pemijatan pada bagian di sekitar kloaka. Semen ditampung menggunakan spuit tuberculin 1 ml. Semen dibagi dalam 7 buah tabung yang masing-masing berisi pengencer dengan perbandingan 10 bagian pengencer dan 1 bagian semen. Semen cair dikemas dalam 0.25 mL straw (IMV, France) dengan konsentrasi spermatozoa  $60 \times 10^6$  setiap straw. Straw didinginkan pada suhu 5 °C selama 2 jam untuk ekuilibrisasi, kemudian

ditempatkan 5 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 10 menit.

Straw diangkat dan dicelupkan dalam nitrogen cair di dalam kontainer dan disimpan selama 24 jam. *Thawing* dilakukan dengan menempatkan straw dalam *waterbath* berisi air dengan suhu 37 °C selama 30 detik.

#### Pengamatan Kualitas Spermatozoa

Kualitas spermatozoa yang diamati yaitu motilitas, viabilitas, abnormalitas dan *recovery rate* spermatozoa. Motilitas spermatozoa diamati dengan menempatkan semen cair di atas kaca preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup. Penilaian viabilitas dan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan pewarna eosin-nigrosin (Merck, KgaA, Darmstadt Germany) dengan cara menempatkan semen dan eosin-nigrosin di atas kaca preparat kemudian dihomogenkan, diulas di atas kaca preparat dan dikeringkan di atas *heating table* selama 5 detik. Pengamatan spermatozoa dilakukan menggunakan

mikroskop binokuler (Boeco, Germany) dengan perbesaran 40x16.

#### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tujuh taraf perlakuan dan 4 kali ulangan. Data motilitas, viabilitas dan abnormalitas setelah pengenceran dan setelah *thawing* serta *recovery rate* dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA), jika F-value signifikan ( $P < 0.05$ ) maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pengencer tidak berpengaruh ( $P > 0.05$ ) terhadap motilitas spermatozoa setelah pengenceran (Tabel 1). Motilitas spermatozoa setelah pengenceran yaitu 82.25-84.75%. Hasil ini hampir sama dengan yang didapatkan sebelumnya pada spermatozoa kerbau setelah pengenceran dengan 0.5-1% BSA yaitu 84.20-85.20% (El-Kon, 2011).

**Tabel 1.** Motilitas spermatozoa (%) setelah pengenceran dan setelah *thawing* dengan pengencer RLKT yang disuplementasi BSA dan putih telur (Mean±SEM)

Perlakuan	Motilitas spermatozoa (%)		
	Setelah pengenceran	setelah <i>thawing</i>	7 jam setelah <i>thawing</i>
Kontrol	82.25±0.75	31.50±1.55	14.00 <sup>a</sup>
BSA 0.5%	84.75±1.75	29.75±2.36	13.50 <sup>a</sup>
BSA 1%	82.75±1.89	27.25±1.49	12.75 <sup>a</sup>
BSA 1.5%	82.75±1.89	26.50±1.55	11.50 <sup>a</sup>
Putih telur 0.5%	83.50±0.50	32.75±1.65	21.25 <sup>b</sup>
Putih telur 1%	84.00±2.12	32.75±1.65	20.25 <sup>b</sup>
Putih telur 1.5%	84.00±2.12	32.00±2.86	20.25 <sup>b</sup>

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ( $P < 0.01$ ). RLKT = ringer laktat kuning telur, BSA = *bovine serum albumin*

Motilitas spermatozoa mengalami penurunan setelah *thawing* dengan kisaran 26.50-32.75% dan tidak berbeda antar perlakuan ( $P > 0.05$ ). Penurunan motilitas spermatozoa setelah *thawing* dapat dipengaruhi oleh suhu, tekanan osmotik dan menurunnya kadar adenosin triposfat (ATP). Menurut Hezavehei *et al.* (2018), kualitas spermatozoa yang rendah setelah

*thawing* disebabkan oleh perubahan suhu mendadak, pembentukan es dan tekanan osmotik. Sedangkan Blesbois (2012) menyatakan bahwa selama kriopreservasi, sel-sel mengalami pengurangan volume karena dehidrasi dan pengaruh krioprotektan internal. Kadar ATP pada semen ayam menurun secara signifikan setelah *thawing* (Madeddu *et al.*, 2010).

ATP dihasilkan oleh bagian tengah (*mid piece*) spermatozoa untuk motilitas spermatozoa (Bennison *et al.*, 2016). Menurut Davila *et al.* (2016), berkurangnya kadar ATP pada spermatozoa disebabkan oleh penghambatan glikolisis oleh deoksiglukosa.

Hasil penelitian ini (Tabel 1) ini sejalan dengan hasil penelitian Akhter *et al.* (2014) bahwa tidak terdapat perbedaan motilitas spermatozoa kerbau pada perlakuan kontrol dengan BSA 1-4 mg/ml setelah thawing. Motilitas spermatozoa ayam setelah thawing dengan suplementasi putih telur dalam pengencer pada penelitian ini hampir sama dengan penelitian sebelumnya pada semen ayam yaitu 32.2-34.7% dengan suplementasi melatonin dalam pengencer (Mehaisen *et al.*, 2020), 32.7% menggunakan *methyl acetamide* (Ehling *et al.*, 2012), 27,73-34,55% menggunakan *N-methyl acetamide* (Kumar *et al.*, 2018) dan 27,25% menggunakan minyak ikan 50 mg/100 ml pengencer (Malik *et al.* 2018).

Perlakuan jenis protein dalam pengencer berpengaruh sangat nyata ( $P < 0.01$ ) terhadap motilitas spermatozoa setelah thawing yang disimpan selama 7 jam pada suhu 5 °C. Penggunaan putih telur sebagai sumber protein mampu mempertahankan motilitas lebih baik daripada BSA. Hal ini mungkin disebabkan

kandungan nutrisi dalam putih telur yang menguntungkan bagi spermatozoa. Menurut Robles *et al.*, (2019), protein dapat menghambat rekristalisasi es dan dapat berinteraksi dengan membran biologis sehingga baik digunakan dalam proses pembekuan. Sedangkan Kowalski *et al.* (2013) menyatakan bahwa suplementasi protein efektif dalam mengurangi adhesi spermatozoa.

Abeyrathne dan Ahn (2013) menyatakan bahwa putih telur mengandung beberapa protein fungsional utama seperti ovalbumin (54%), ovotransferrin (12%), ovomucoid (11%), ovomucin (3,5%), dan lisozim (3,5%). Ovomucin dapat dianggap sebagai sumber nutrisi yang baik karena dapat mensuplai 2 nutrisi penting yaitu protein dan karbohidrat. Sekitar 33% dalam ovomucin tersusun atas karbohidrat (Omana *et al.*, 2010).

Sebagaimana diketahui bahwa karbohidrat adalah sumber energi bagi spermatozoa dan juga dapat bertindak sebagai krioprotektan. Penelitian sebelumnya pada spermatozoa sapi menunjukkan bahwa penggunaan putih telur mampu menggantikan BSA dalam pengencer CEP untuk semen yang disimpan pada suhu 3-5°C ditinjau dari persentase motilitas, persentase viabilitas, dan persentase abnormalitas spermatozoa sapi PO (Sholikhah *et al.*, 2016).

**Tabel 2.** *Recovery rate* (%) spermatozoa (%) setelah pengenceran dan setelah thawing dengan pengencer RLKT yang disuplementasi BSA dan putih telur (Mean±SEM)

Perlakuan	Recovery rate (%)
Kontrol	35.40±1.77
BSA 0.5%	33.41±2.58
BSA 1%	30.60±1.56
BSA 1.5%	29.77±1.68
Putih telur 0.5%	36.79±1.78
Putih telur 1%	36.79±1.78
Putih telur 1.5%	35.93±3.13

Keterangan: RLKT = ringer laktat kuning telur, BSA = bovine serum albumin

Penggantian BSA dengan putih telur 0,4-0,8% dapat mempertahankan kualitas semen sapi Limousin hingga jam ke-48

penyimpanan pada suhu dingin (Susilawati *et al.*, 2016). Penambahan BSA tidak mampu meningkatkan motilitas

spermatozoa ayam pada penelitian ini. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Sariözkan *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa suplementasi pengencer dengan BSA dan *fetal calf serum* (FCS) tidak mampu meningkatkan motilitas spermatozoa kelinci pada penyimpanan 48 jam.

Persentase spermatozoa yang pulih kembali setelah pembekuan (*recovery rate*) yang dihasilkan tidak berbeda ( $P>0.05$ ) antar perlakuan, dengan kisaran 29.77-36.79%. Hasil ini serupa dengan penelitian sebelumnya yaitu 36% menggunakan trehalosa 100 mM pada spermatozoa ayam lohman (Mosca *et al.*, 2016). Sedangkan pada penelitian lainnya yaitu 33.54-36.95% menggunakan gliserol 7-9% pada spermatozoa ayam sentul, 34.36% menggunakan DMSO 5% pada spermatozoa ayam kampung dan 31.58% menggunakan DMA 9% pada spermatozoa ayam kampung broiler (Junaedi *et al.*, 2016b; Junaedi *et al.*, 2016a; Junaedi *et al.*, 2017).

### Viabilitas Spermatozoa Ayam Kampung

Suplementasi BSA dan putih telur tidak menghasilkan perbedaan ( $P>0.05$ ) viabilitas spermatozoa setelah pengenceran dengan kisaran 95.93-98.52%. Hasil yang didapatkan lebih tinggi dari yang didapatkan oleh Kim *et al.* (2017) yaitu 89.1% pada spermatozoa ayam Ogye 3 menit setelah diencerkan dengan BSA 0.75%. Demikian juga dengan El-Kon (2011) mendapatkan

viabilitas 88.3% pada spermatozoa kerbau setelah pengenceran dengan 0.5% BSA. Pembekuan menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa yang signifikan. Pembekuan spermatozoa unggas menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid, kerusakan struktural pada mitokondria dan daerah akrosom, perubahan integritas dan permeabilitas membran plasma, denaturasi DNA dan kerusakan kromatin (Blesbois *et al.*, 2005; Partyka *et al.*, 2010; Partyka *et al.*, 2012). Viabilitas spermatozoa setelah *thawing* berbeda ( $P<0.05$ ) antar perlakuan (Tabel 3).

Viabilitas spermatozoa paling tinggi diperoleh pada pengenceran dengan putih telur 1.5% (44.33%) jika dibandingkan dengan kontrol, pengencer BSA 1% dan 2% serta pengencer putih telur 0.5% namun tidak berbeda dengan viabilitas spermatozoa dalam pengencer BSA 0.5% dan putih telur 1%.

Hasil penelitian ini menunjukkan kecenderungan peningkatan viabilitas spermatozoa setelah dengan peningkatan level putih telur namun cenderung menurun dengan peningkatan level BSA. Sejalan dengan hasil penelitian Adnani *et al.*, (2012) yang menunjukkan bahwa peningkatan level BSA 1% menjadi 1.5% dalam bahan pengencer kuning telur fosfat menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa anjing pada penyimpanan 4° C.

**Tabel 3.** Viabilitas spermatozoa (%) setelah pengenceran dan setelah thawing dengan yang disuplementasi BSA dan putih telur (Mean±SEM)

Perlakuan	Viabilitas spermatozoa (%)	
	Setelah pengenceran	Setelah thawing
Kontrol	95.93±1.43	33.74±2.82 <sup>a</sup>
BSA 0.5%	97.36±1.28	38.99±3.54 <sup>ab</sup>
BSA 1%	98.11±0.62	34.71±1.20 <sup>a</sup>
BSA 1.5%	97.73±0.83	32.73±2.53 <sup>a</sup>
Putih telur 0.5%	98.52±1.22	31.63±2.05 <sup>a</sup>
Putih telur 1%	97.92±0.12	37.72±1.90 <sup>ab</sup>
Putih telur 1.5%	97.42±0.76	44.33±1.96 <sup>b</sup>

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh yang signifikan ( $P<0.05$ ).

RLKT = ringer laktat kuning telur, BSA = bovine serum albumin

Kandungan fungsional lain dalam putih telur yang mungkin berpengaruh baik bagi spermatozoa selain ovomucin adalah ovotransferrin sebagai antioksidan dan lisozim sebagai antibakteri. Menurut Abeyrathne dan Ahn (2013), peptida yang berasal dari ovotransferrin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Moon *et al.*, (2013) menyatakan bahwa ovotransferrin menunjukkan efek perlindungan terhadap stres oksidatif termasuk kerusakan DNA pada leukosit manusia. Sedangkan Lisozim adalah salah satu protein bakteriolitik utama yang ditemukan dalam putih telur (Abeyrathne dan Ahn, 2013). Viabilitas spermatozoa yang diperoleh menggunakan pengencer putih telur 1.5% hampir sama dengan penelitian sebelumnya yaitu 43.97% menggunakan media polividil pyrrolidone (Thananurak *et al.*, 2017) dan 45% menggunakan pengencer *Beltsville* dengan 4% *low density lipoprotein* (Shahverdi *et al.*, 2015). Hasil ini bahkan lebih tinggi dari yang didapatkan Fattah *et al.* (2017) yang

mendapatkan 27.1% menggunakan pengencer yang mengandung 8 mM L-karnitin. Kuning telur dalam pengencer ringer laktat pada penelitian ini juga diduga turut melindungi spermatozoa selama pendinginan dan pembekuan. Hal ini sesuai dengan pendapat Orrego *et al.*, (2019) bahwa pengencer kuning telur mengandung *low density lipoprotein* yang dapat bertindak sebagai krioprotektan.

#### Abnormalitas Spermatozoa Ayam Kampung

Perlakuan berbagai pengencer tidak berpengaruh ( $P > 0.05$ ) terhadap abnormalitas spermatozoa setelah pengenceran maupun setelah *thawing*. Abnormalitas setelah pengenceran 8.75-10.18% sedangkan abnormalitas spermatozoa setelah *thawing* 9.18-11.17% (Tabel 4). Hasil ini hampir sama dengan yang didapatkan El-Kon (2011) bahwa abnormalitas spermatozoa kerbau setelah pengenceran dengan 0.5-1% BSA adalah 8.88-9.40 %.

**Tabel 4.** Abnormalitas spermatozoa (%) setelah pengenceran dan setelah *thawing* dengan pengencer RLKT yang disuplementasi BSA dan putih telur (Mean±SEM)

Perlakuan	Abnormalitas spermatozoa (%)	
	Setelah pengenceran	Setelah <i>thawing</i>
Kontrol	10.01±0.69	11.17±0.98
BSA 0.5%	10.11±0.75	10.66±0.77
BSA 1%	10.18±0.77	10.84±0.31
BSA 1.5%	10.08±0.50	10.93±0.62
Putih telur 0.5%	10.09±1.14	10.55±0.73
Putih telur 1%	8.88±0.74	9.18±0.32
Putih telur 1.5%	8.75±0.87	9.58±1.57

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh yang signifikan ( $P < 0.05$ ). RLKT = ringer laktat kuning telur, BSA = bovine serum albumin

Abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini juga hampir sama dengan penelitian Nugroho dan Saleh (2016) yaitu 6,75-13,50% pada spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada suhu 5 °C. Abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini cukup rendah dan kurang dari 20%. Menurut Feradis (2010), setiap spermatozoa abnormal (baik primer atau sekunder) tidak

dapat membuahi ovum, tetapi selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dari contoh semen, maka semen tersebut masih dapat digunakan untuk inseminasi. Abnormalitas primer, terjadi karena kelainan-kelainan spermatogenesis dalam tubuli seminiferi, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi di luar tubuli seminiferi selama ejakulasi karena

pemanasan atau pendinginan yang berlebih atau terkontaminasi air, urin dan antiseptik. Bentuk spermatozoa abnormal pada penelitian ini umumnya berupa pembengkokan pada bagian kepala, tengah, dan ekor. Menurut Jamieson (2007), jika dibandingkan dengan spermatozoa mamalia, sebagian besar abnormalitas spermatozoa burung dari kelompok *passerine* adalah pembengkokan bagian tengah di sekitar *flagellum*.

Sedangkan penelitian Ameen *et al.* (2014) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa pada ayam ras strain Hubbard dan Isa White didominasi oleh abnormalitas kepala.

## KESIMPULAN

Putih telur 1.5% merupakan sumber protein terbaik untuk disuplementasi ke dalam ringer laktat kuning telur sebagai pengencer pada pembekuan semen ayam kampung.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Direktorat Jenderal Kelembagaan Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan berupa 2 buah mikroskop kepada Laboratorium Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Muhammadiyah Sinjai melalui Program Pembinaan Perguruan Tinggi Swasta (PP-PTS) tahun 2019.

## DAFTAR PUSTAKA

Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review. *Poultry Science*, 92(12), 3292–3299. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03391>

Adnani L.P.D.H., W. B. dan M. K. B. (2012). Penambahan bovine serum albumin pada pengencer kuning telur terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa anjing. *Indonesia*

*Medicus Veterinus*, 1(4), 519–529.

- Ajayi, O. S., & Adediwura, J. A. (2014). Evaluation of semen quality of five different cockerel breed used in poultry industry in Nigeria. *Journal of Environmental Issues and Agriculture in Developing Countries*, 30(36), 30–36.
- Akhter S, B.A. Rakha, R. I. and M. S. A. (2014). Effect of bovine serum albumin on motility, plasmalemma, viability and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(1), 115–120.
- Amidi, F., Farshad, A., & Khor, A. K. (2010). Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 61(1), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.05.006>
- Azawi, O.I., and E. K. H. (2011). Study on the effect of adding bovine serum albumin to semen diluent on the viability of awassi ram semen preserved at 5oC. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 1(3), 115–118.
- Bennison, C., Hemmings, N., Brookes, L., Slate, J., & Birkhead, T. (2016). Sperm morphology, adenosine triphosphate (ATP) concentration and swimming velocity: unexpected relationships in a passerine bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1837), 20161558. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1558>
- Blesbois, E., Grasseau, I., & Seigneurin, F. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129(3), 371–378. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00454>
- Cabrera, E., Anel, L., & Herraéz, M. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56(4), 623–635.



- [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00594-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00594-5)
- Davila, M. P., Muñoz, P. M., Bolaños, J. M. G., Stout, T. A. E., Gadella, B. M., Tapia, J. A., da Silva, C. B., Ferrusola, C. O., & Peña, F. J. (2016). Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. *Reproduction*, *152*(6), 683–694. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0409>
- Ehling C., U. Taylor, U. Baulain, S. Weigend, M. H. and D. R. (2012). Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Journal For Research*, *62*(3), 151–158.
- El-Kon I. (2011). Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of egyptian buffalo semen. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, *11*(4), 49–502.
- Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaili, V., & Najafi, A. (2017). L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, *74*, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.009>
- Feradis. (2010). *Bioteknologi reproduksi pada ternak*. Alfabeta.
- Fitriyah N. Humaidah dan D. Suryanto. (2019). Pengaruh lama penyimpanan semen dalam pengencer ringer's lactat yang disimpan pada suhu 4 oC terhadap kualitas spermatozoa ayam Magon. *Jurnal Rekasatwa Peternakan*, *1*(1), 28–37.
- Fu, J., Li, Y., Wang, L., Zhen, L., Yang, Q., Li, P., & Li, X. (2017). Bovine serum albumin and skim-milk improve boar sperm motility by enhancing energy metabolism and protein modifications during liquid storage at 17 °C. *Theriogenology*, *102*, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.020>
- Ghallab, A. M., Shahat, A. M., Fadl, A. M., Ayoub, M. M., & Moawad, A. R. (2017). Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*, *79*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.001>
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, *37*(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Indrawati D., W. B. dan I. G. N. T. (2013). Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung dengan penambahan astaxanthin pada suhu 3-5oC. *Indonesia Medicus Veterinus*, *2*(4), 445–452.
- Inggriani, K., Tethool, A. N., & Lumatauw, S. (2020). Pengaruh ekstrak sarang semut (*Myrmecodia* Sp) dalam pengencer ringer laktat terhadap abnormalitas dan viabilitas spermatozoa ayam kampung. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*, *10*(1), 1. <https://doi.org/10.46549/jipvet.v10i1.67>
- Isnaeni, M., Faidiban, O. R., & Tethool, A. N. (2019). Konsentrasi dan motilitas spermatozoa ayam kampung (*Gallus domesticus*) dalam pengencer ringer laktat yang diberi tambahan minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam). *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis*, *9*(2), 44. <https://doi.org/10.30862/jipvet.v9i2.65>
- Jamieson, B. G. M. (2007). *Avian spermatozoa: structure and phylogeny*. science publisher.
- Junaedi, J., Arifiantini, R. I., & Sumantri, C. (2017). The quality of kampung broiler (KB) Chicken frozen semen

- with DMA concentrations on yolk lactate ringer diluent. *Chalaza Journal of Animal Husbandry*, 2(2), 19–24. <https://doi.org/10.31327/chalaza.v2i2.292>
- Junaedi, J., Arifiantini, R. I., Sumantri, C., & Gunawan, A. (2016a). Use of glycerol as cryoprotectants in freezing sentul chicken semen. *Chalaza Journal of Animal Husbandry*, 1(2), 6–13. <https://doi.org/10.31327/chalaza.v1i2.165>
- Junaedi, J., Arifiantini, R., Sumantri, C., & Gunawan, A. (2016b). The use of dimethyl sulfoxide as cryoprotective agent for native chicken frozen semen. *Jurnal Veteriner*, 17(2), 300–308. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.2.300>
- Kim, S. W., Kim, M. S., Yu, Y., Kim, C.-L., Jeon, I. S., & Kim, C. (2017). The effects of supplementation of BSA or fatty acid free BAS on the motility of fresh or cryopreserved rooster spermatozoa. *Korean Journal of Poultry Science*, 44(1), 59–65. <https://doi.org/10.5536/KJPS.2017.44.1.59>
- Kowalski, R. K., Cejko, B. I., Krejszef, S., Sarosiek, B., Judycka, S., Targońska, K., Kucharczyk, D., & Glogowski, J. (2014). Effect of albumin and casein supplementation on the common carp *Cyprinus carpio* L. sperm motility parameters measured by CASA. *Aquaculture International*, 22(1), 123–129. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9673-2>
- Madeddu, M., Berlinguer, F., Pasciu, V., Succu, S., Satta, V., Leoni, G. G., Zinellu, A., Muzzeddu, M., Carru, C., & Naitana, S. (2010). Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (*Gallus gallus domesticus*) and the Barbary partridge (*Alectoris barbara*). *Theriogenology*, 74(6), 1010–1018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.001>
- Magfira, M., Arifiantini, R. I., Karja, N. W. K., & Darwati, S. (2017). Effectiveness of low density lipoprotein and egg yolk from chicken and quail on merawang semen preservation. *Jurnal Veteriner*, 18(3), 345. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.3.345>
- Malik, A., Zakir, M.I., Sasongko, N. (2018). The addition of fish oil into skim milk-egg yolk extender on the sperm motility and abnormalities post thawed of native chicken. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan*, 21(2), 55–69. <https://doi.org/10.22437/jiip.v21i2.5823>
- Mehaisen, G. M. K., Partyka, A., Ligocka, Z., & Nizański, W. (2020). Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 212, 106238. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106238>
- Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Chang, K. H., Paik, J. Y., Ahn, D. U., & Paik, H. D. (2013). Screening for cytotoxic activity of ovotransferrin and its enzyme hydrolysates. *Poultry Science*, 92(2), 424–434. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02680>
- Mosca, F., Madeddu, M., Sayed, A. A., Zaniboni, L., Iaffaldano, N., & Cerolini, S. (2016). Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm. *Data in Brief*, 9, 1118–1121. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.11.059>
- Nugroho, A. P., & 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. <https://doi.org/10.29244/avi.4.1.35-41>
- Omana, D. A., Wang, J., & Wu, J. (2010). Co-extraction of egg white proteins using ion-exchange chromatography from ovomucin-removed egg whites.

- Journal of Chromatography B*, 878(21), 1771–1776. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.037>
- Orrego, M. T., Melian, S. I., Montenegro, J., Cimato, A. N., Cisale, H., & Piehl, L. L. (2019). Boar sperm protein tyrosine phosphorylation in the presence of egg yolk soluble and low density lipoprotein fractions during cooling. *Theriogenology*, 123, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.031>
- Partyka, A., Łukaszewicz, E., & Nizański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77(8), 1497–1504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006>
- Partyka, A., Nizański, W., & Łukaszewicz, E. (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*, 74(6), 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.032>
- Pranay, K., Swathi, B., & Shanmugam, M. (2018). Cryopreservation of rooster semen using n-methylacetamide as cryoprotective agent. *International Journal of Agriculture Sciences(IJAS)*, 10(3), 5123. <https://doi.org/10.9735/0975-3710.10.3.5123-5126>
- Pratiwi, N., Yusuf, T. L., Arifiantini, I., & Sumantri, C. (2019). Kualitas spermatozoa dalam modifikasi pengencer ringer laktat kuning telur dengan tambahan astaxanthin dan glutathione pada tiga jenis ayam lokal. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 7(1), 46–54. <https://doi.org/10.29244/avi.7.1.46-54>
- Robles, V., G. Valcarce, D., & F. Riesco, M. (2019). The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*, 9(5), 181. <https://doi.org/10.3390/biom9050181>
- Saleh T.V., and M. M. (2016). Effect of bovine serum albumin of sperm motility parameters and fertility of indigenous rooster. *Journal of Animal Production*, 18(2), 397–408.
- Sandal, A. I., Senlikci, H., Baran, A., & Ozdas, O. B. (2020). Sığır serum albumin (BSA) katkili sulandiricinin +4°C'de saklanan saanen teke spermasinin spermatolojik özellikleri üzerine etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2019.23674>
- Santoso I.B., D. M. S. dan S. M. (2020). Pengaruh level kuning telur pada pengencer susu skim dan lama waktu penyimpanan terhadap motilitas dan abnormalitas spermatozoa ayam kampung. *Journal Animal Science Technology*, 2(1), 1–11.
- Sarıözkan, S., Türk, G., Cantürk, F., Yay, A., Eken, A., & Akçay, A. (2013). The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology*, 67(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.002>
- Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A. A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.044>
- Sholikhah, N., Isnaini, N., Puspita Anugra Yekti, A., & Susilawati, T. (2016). Pengaruh penggantian Bovine Serum Albumin (BSA) dengan putih telur pada pengencer CEP-2 terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole pada suhu penyimpanan 3-5oC. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 26(1), 7–15. <https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2016.026.01.2>
- Susilawati, T., Wahyudi, F. E., Anggraeni,

- I., Isnaini, N., & Ihsan, M. N. (2016). The Substitution of Bovine Serum Albumin with Cattle Blood Serum and Egg White in CEP-2 Diluent on. *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 10(2), 98–102. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v10i2.5025>
- Thananurak P., N. Chusychu-noo and, & T. Vongpralub. (2017). Freezability and fertility of Thai native chicken semen in different diluents. *Thai J Vet Med*. 2017, 47(4), 551–556.
- Widiastuti W.A., W. B. dan I. N. G. B. T. (2018). Penggunaan berbagai kuning telur sebagai bahan pengencer terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam Pelung. *Indonesia Medicus Veterinus*, 7(3), 252–261.