

Dampak Dosis Etilen Glikol terhadap Kualitas Semen Ayam Gaga dan Pengamatan Ultrastruktur Spermatozoa Pascakriopreservasi

(THE IMPACT OF ETHYLENE GLYCOL DOSAGE ON THE QUALITY OF GAGA CHICKEN SEMEN AND SPERMATOZOA ULTRASTRUCTURAL OBSERVATIONS POST-CRYOPRESERVATION)

Muhammad Robbaani¹, Khaeruddin², Achadiah Rachmawati³, Aulia Puspita Anugra Yekti³, Ita Wahyu Nursita³, Sri Wahjuningsih^{3*}

¹Mahasiswa Magister Program Studi Ilmu Ternak,
Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia.

²Program Studi Peternakan,
Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai,
Sulawesi Selatan 92615, Indonesia

³Departemen Peternakan, Fakultas Peternakan,
Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur, 65145 Indonesia
Email: yuning@ub.ac.id

ABSTRACT

Studies on (ethylene glycol (EG) for cryopreservation of Gaga chicken semen are limited. Therefore, this study was aimed to investigate the effect of EG (cryoprotectant) during freezing as well as thawing, using treatments that include 7% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)/control (T0), 5% EG (T1), 7% EG (T2), and 9% EG (T3), each with 10 replicates in egg yolk–Ringer’s lactate (EYRL). The variables evaluated in this study included sperm motility, viability, morphology, recovery rate, post-thaw viability loss, abnormality increase and ultrastructure by using Field Emission-Scanning Electron Microscope (FE-SEM). Semen from three 10–12-month-old roosters was collected by massage, diluted, equilibrated (5°C, 2 h), pre-freezing (10 min), stored in liquid nitrogen (–196°C, 24 h), and thawed (37°C, 30 s). The results showed that EG significantly affected post-thaw motility and viability ($P < 0.05$), but not abnormalities ($P > 0.05$). Control (T0) had the highest recovery and lowest viability loss, while 7% EG (T2) gave the poorest recovery. Spermatozoa viability declined most at 9% EG (T3). abnormalities were lowest at 5% EG (T1) but highest at 9% EG (T3). The FE-SEM revealed spermatozoa acrosomal damage after freezing, with midpieces mostly intact.

Keywords: Gaga chicken semen; Cryopreservation; Cryoprotectant; Ethylene glycol

ABSTRAK

Penelitian mengenai etilen glikol (EG) untuk kriopreservasi semen ayam gaga masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek EG sebagai krioprotektan spermatozoa selama proses pembekuan (kriopreservasi) maupun pencairan (*thawing*). Penelitian ini menggunakan perlakuan yang mencakup 7% dimetil sulfolida (DMSO) sebagai kontrol (P0), 5% EG (P1), 7% EG (P2), dan 9% EG (P3), masing-masing perlakuan dengan 10 ulangan dalam pengencer Ringer laktat kuning telur (RLKT). Evaluasi meliputi pengamatan pada sejumlah parameter antara lain, motilitas spermatozoa, viabilitas, abnormalitas, *recovery rate*, penurunan viabilitas pasca-pencairan, peningkatan abnormalitas dan ultrastruktur spermatozoa melalui pengamatan pada *Field Emission-Scanning Electron Microscope* (FE-SEM). Semen diperoleh dari tiga ayam gaga jantan berumur 10–12 bulan. Semen dikoleksi dengan metode pijat (*massage*). Semen yang diperoleh diencerkan dan diekuilibrasikan (5°C , 2 jam), *pre-freezing* (10 menit) dan disimpan dalam nitrogen (N_2) cair (-196°C , 24 jam), dan dilakukan pengenceran (*thawing*) (37°C , 30 detik). Hasil penelitian menunjukkan bahwa EG secara signifikan memengaruhi motilitas dan viabilitas spermatozoa pascapencairan ($P < 0,05$), tetapi tidak memengaruhi abnormalitas ($P > 0,05$). Spermatozoa pada perlakuan kontrol (P0) memiliki nilai *recovery rate* tertinggi dan penurunan viabilitas terendah, sementara EG 7% (P2) memberikan nilai *recovery rate* terendah. Penurunan viabilitas spermatozoa tertinggi terjadi pada EG 9% (P3). Abnormalitas spermatozoa terendah terjadi pada perlakuan EG 5% (P1) dan tertinggi pada perlakuan EG 9% (P3). Pemeriksaan FE-SEM menunjukkan adanya kerusakan pada akrosom spermatozoa setelah pembekuan dan sebagian besar bagian tengah masih utuh.

Kata-kata kunci: semen ayam gaga; kriopreservasi krioprotektan; etilen glikol

PENDAHULUAN

Ayam gaga merupakan ayam lokal Indonesia yang berasal dari Kabupaten Sindereng Rappang, Sulawesi Selatan dengan ciri khas yang unik, yaitu suaranya seperti manusia yang sedang tertawa. Keunikan ini menjadi daya tarik bagi para pecinta ayam untuk memeliharanya dan suara kokokannya seringkali dikompetisikan. Populasi ayam gaga yang masih terbatas merupakan kekayaan sumber daya genetik ternak Indonesia yang perlu dilindungi dan dilestarikan (Wahjuningsih *et al.*, 2025). Pemerintah telah menerbitkan Surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2920/Kpts/OT.140/6/2011 yang menyatakan bahwa ayam gaga telah ditetapkan sebagai plasma nutfah ternak lokal Indonesia dengan potensi genetik yang penting. Oleh karena itu, perlindungan hukum diberikan bagi pelestarian budidaya ayam lokal (Khaeruddin *et al.*, 2022).

Salah satu solusi yang dipilih untuk

melestarikan plasma nutfah ayam gaga adalah kriopreservasi semen. Kriopreservasi adalah proses penyimpanan sampel biologis seperti sel, jaringan, dan embrio dalam jangka waktu tertentu dengan menghentikan metabolisme sel pada suhu yang sangat rendah, biasanya menggunakan nitrogen cair pada suhu -196°C (Jang *et al.*, 2017). Proses ini dilaporkan dapat mendukung penyimpanan semen ayam selama 18 tahun dalam nitrogen cair, yang menunjukkan efektivitas tinggi dalam mengawetkan sumber daya genetik (Thélie *et al.*, 2019). Kriopreservasi tidak dapat berhasil secara optimal tanpa menggunakan krioprotektan selama pembekuan. Krioprotektan dapat melindungi sel hidup dengan menembus ke dalam membran tanpa menciptakan efek mematikan, seperti kristal es yang terbentuk selama pembekuan (Bhattacharya dan Prajapati, 2016).

Kemampuan spermatozoa untuk bergerak aktif sangat dibutuhkan untuk terjadinya fertilisasi. Semakin tinggi nilai moti-

litas, maka semakin baik kualitas spermatozoa dan peluang fertilitas juga semakin besar (Woli *et al.*, 2017). Motilitas dapat menurun setelah kriopreservasi karena beberapa faktor, seperti stres oksidatif, paparan suhu ekstrem, dan kerusakan membran plasma selama pembekuan (Darsini *et al.*, 2019). Selain itu, viabilitas sperma dapat digunakan sebagai parameter penting untuk menilai kualitas semen. Viabilitas merupakan perbandingan antara jumlah spermatozoa yang hidup dan mati (Kudratullah dan Sudrajat, 2021).

Krioprotektan memiliki efek toksik pada spermatozoa apabila dosis yang diberikan tidak sesuai dengan kadarnya, sehingga dapat menyebabkan kematian (Best, 2015). Abnormalitas spermatozoa adalah kondisi spermatozoa berbentuk tidak normal. Kelainan ini dapat terjadi pada beberapa bagian struktur morfologi sperma, seperti kepala, bagian tengah dan ekor (Mavi *et al.*, 2019). Abnormalitas spermatozoa dapat berupa kepala yang sangat besar atau kecil, bagian tengah yang bengkok, serta ekor yang bercabang, melingkar dan patah (Ardhani *et al.*, 2019). Perubahan motilitas, viabilitas, abnormalitas sebelum dan sesudah kriopreservasi dipengaruhi oleh jenis krioprotektan yang digunakan dan dosisnya. Penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Khaeruddin *et al.* (2020) mengemukakan bahwa penggunaan *Etilen Glikol* (EG) sebagai krioprotektan untuk semen ayam kampung tidak menemukan perbedaan yang signifikan dalam motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah pencairan. Namun, belum terdapat penelitian yang melaporkan mengenai penggunaan EG dengan dosis bertingkat sebagai krioprotektan semen ayam gaga. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan efektivitas EG dengan dosis bertingkat sebagai krioprotektan semen ayam gaga.

METODE PENELITIAN

Koleksi Semen

Pengoleksian semen ayam gaga menggunakan metode *massage* atau pijat,

yaitu ayam jantan dipijat dari bagian punggung hingga satu sentimeter di belakang kloaka, kemudian ditekan di sekitar pangkal ekor hingga *phallus* bereaksi keluar dari kloaka dan semen keluar (Azizah *et al.*, 2023). Metode ini membutuhkan minimal dua orang, dengan satu orang memegang ayam dan melakukan pijatan dan yang lainnya bertugas sebagai kolektor semen (Junardi *et al.*, 2016). Semen yang telah dikoleksi menggunakan spuit 1 mL, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube dan ditutup untuk menghindari kontaminasi dari luar. Semen yang diperoleh biasanya berwarna putih susu dengan tekstur kental.

Komposisi Pengencer RLKT

Pengencer ringer laktat kuning telur (RLKT) terdiri atas 90% ringer laktat (Wida RL Infus[®], PT Widatra Bakti, Pandaan, Indonesia) dan 10% kuning telur, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit (Hidayat *et al.*, 2016). Ringer laktat yang digunakan mengandung 3 g natrium klorida, 1,55 g natrium laktat, 0,155 g kalium klorida, dan 0,1 g kalsium klorida, yang dilarutkan dengan 500 mL air steril. Sekitar 10 mL supernatan yang diperoleh ditambahkan dengan 1000 IU penisilin (Crystalline Procaine Penicillin-G Meiji[®], PT Meiji, Bangil, Indonesia) dan 1 mg/mL streptomisin (Streptomycin Sulfate Meiji[®], PT Meiji, Bangil, Indonesia). Campuran ini dihomogenkan dengan menambahkan tris hidroksimetil aminometana (Tris(Hydroxymethyl) Aminomethane GR for Analysis[®], Merck KGaA, Darmstadt, Jerman) secara bertahap hingga larutan mencapai pH 8. Selanjutnya, pengencer dibagi menjadi empat perlakuan dengan penambahan dimetil sulfoksida (Dimethyl Sulfoxide (DMSO)[®], Merck KGaA, Darmstadt, Jerman) dan EG (Ethylene Glycol[®], Merck KGaA, Darmstadt, Jerman) sebagai krioprotektan.

Perlakuan tersebut terdiri atas P0 (RLKT + 7% DMSO) sebagai kontrol, P1 (RLKT + 5% EG), P2 (RLKT + 7% EG), dan P3 (RLKT + 9% EG). Selain itu, penambahan antioksidan terbukti dapat meningkatkan pengawetan spermatozoa unggas jangka panjang secara *in vivo* dan *in vitro*

(Blesbois, 2018).

Tahapan Kriopreservasi

Semen yang terkumpul dimasukkan ke dalam empat mikrotube yang berbeda dan diencerkan dengan masing-masing perlakuan yang telah disiapkan. Semen yang telah diencerkan dikemas ke dalam beberapa *straw* (0,25 mL) dengan konsentrasi 60 juta spermatozoa per *straw* (Khaeruddin *et al.*, 2020). *Straw* diekuilibrasikan dengan cara dimasukkan ke dalam *freezer* selama dua jam pada suhu 5°C (Khaeruddin dan Kurniawan, 2020). *Pre-freezing* dilakukan dengan meletakkan rak pembekuan ke dalam *styrofoam*, kemudian dituangkan nitrogen cair hingga ketinggian permukaan nitrogen cair dengan permukaan rak 3 cm (Madeddu *et al.*, 2016), kemudian *straw* diletakkan di rak dan dibiarkan selama 10 menit (Mosca *et al.*, 2016). Semen disimpan dalam tangki nitrogen cair untuk pembekuan pada suhu sangat rendah, yaitu -196°C. Setelah 24 jam, *thawing* dilakukan dengan merendam *straw* dalam air bersuhu 37°C selama 30 detik (Wahjuningsih *et al.*, 2024).

Motilitas Spermatozoa

Evaluasi motilitas spermatozoa dilakukan sebelum pembekuan dan setelah pencairan menggunakan *upright microscope* (Microscope Olympus type BX53®, Olympus Co, Tokyo, Jepang) dengan perbesaran 400 kali pada lima lapang pandang berbeda. Penilaian subjektif dilakukan dengan membandingkan spermatozoa hidup yang ditandai dengan spermatozoa bergerak dan spermatozoa mati yang ditandai dengan spermatozoa tidak bergerak, apabila spermatozoa lebih banyak yang bergerak menunjukkan motilitas di atas 50% (Sun *et al.*, 2019). Preparat yang sama digunakan untuk pengamatan gerak massa dengan perbesaran 100 kali. Hal ini serupa dengan pengamatan motilitas, namun pengamatan gerak massa tidak menggunakan *cover glass*. Gerak massa memiliki tiga kelompok kategori, yaitu +++ (gerakan cepat dan kental), ++ (gerakan cepat dan encer/lambat dan kental), dan + (gerakan lambat dan encer).

Viabilitas Spermatozoa

Evaluasi viabilitas spermatozoa menggunakan metode pewarnaan eosin nigrosin. Semen dicampur dengan eosin nigrosin sebagai pewarna dan diamati menggunakan *upright microscope* (Microscope Olympus type BX53®, Olympus Co, Tokyo, Jepang) dengan perbesaran 400 kali pada 10 lapang pandang berbeda. Spermatozoa yang mati ditandai dengan menyerap warna, sedangkan sperma yang tidak menyerap warna dikategorikan hidup. Penjumlahan spermatozoa hidup dan mati dilakukan sebagai pembandingan, dengan jumlah yang dihitung ≥ 200 . Rumus untuk menghitung persentase viabilitas spermatozoa adalah sebagai berikut: Viabilitas (%) = [(spermatozoa hidup) x (spermatozoa mati)⁻¹] x 100%.

Abnormalitas Spermatozoa

Sampel yang digunakan untuk evaluasi viabilitas spermatozoa juga digunakan untuk pengamatan abnormalitas spermatozoa. Pengamatan dilakukan menggunakan *upright microscope* (Microscope Olympus type BX53®, Olympus Co, Tokyo, Jepang) dengan perbesaran 400 kali. Abnormalitas spermatozoa ditemukan pada bagian kepala spermatozoa (bersimpul, sangat panjang atau pendek, bengkak dan tanpa ekor), bagian tengah (bengkok, menebal dan kehilangan bagian tengah), akrosom (terlepas dan bengkak) dan ekor (tanpa kepala, bengkok 90°, bengkok 180°, tergulung dan bersimpul). Serupa dengan pengamatan viabilitas, penjumlahan spermatozoa normal dan abnormal dilakukan pada 10 lapang pandang berbeda dengan total ≥ 200 spermatozoa. Rumus untuk menghitung persentase abnormalitas spermatozoa adalah sebagai berikut: Abnormalitas (%) = [(spermatozoa abnormal) x (total spermatozoa)⁻¹] x 100%.

Recovery Rate

Recovery rate merupakan parameter untuk menentukan kualitas spermatozoa, terutama dalam motilitas spermatozoa. Hal ini dapat digunakan untuk mengevaluasi kemampuan dan ketahanan spermatozoa hidup yang telah melewati proses kriopreservasi dan pencairan. Selain itu, peubah ini ber-

fungsi sebagai tolak ukur keberhasilan kriopreservasi, termasuk efek krioprotektan yang digunakan dan kondisi setelah pencairan. *Recovery rate* dapat dihitung menggunakan rumus: $Recovery\ rate\ (\%) = [(motilitas\ setelah\ pencairan \times (motilitas\ sebelum\ pembekuan)^{-1}] \times 100\%$.

Analisis Scanning Electron Microscope (SEM)

Semen ayam gaga dicuci dengan 0,9% NaCl dengan teknik sentrifugasi, kemudian preparat difiksasi menggunakan 2,5% glutaraldehid selama 4 jam, dicuci dengan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) sebanyak 3 kali dan didehidrasi dengan alkohol bertingkat. Preparat ditempelkan pada *stub* dan dilapisi dengan emas (*gold*). Ultrastruktur spermatozoa diamati pada *Field Emission-Scanning Electron Microscope* (FEI Quanta 600, Thermo Fisher Scientific Co, Eindhoven, Belanda) dengan perbesaran hingga 20.000 kali dan tegangan percepatan 10 kV (Khaeruddin *et al.*, 2024).

Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dengan empat perlakuan dan 10 kali pengulangan. Sementara data Evaluasi spermatozoa dilakukan berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varians dengan perangkat lunak IBM SPSS *Statistics* versi 25. Hasil yang menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan, dilakukan uji lanjut menggunakan uji jarak berganda Duncan. Selain itu, data hasil evaluasi juga dijelaskan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

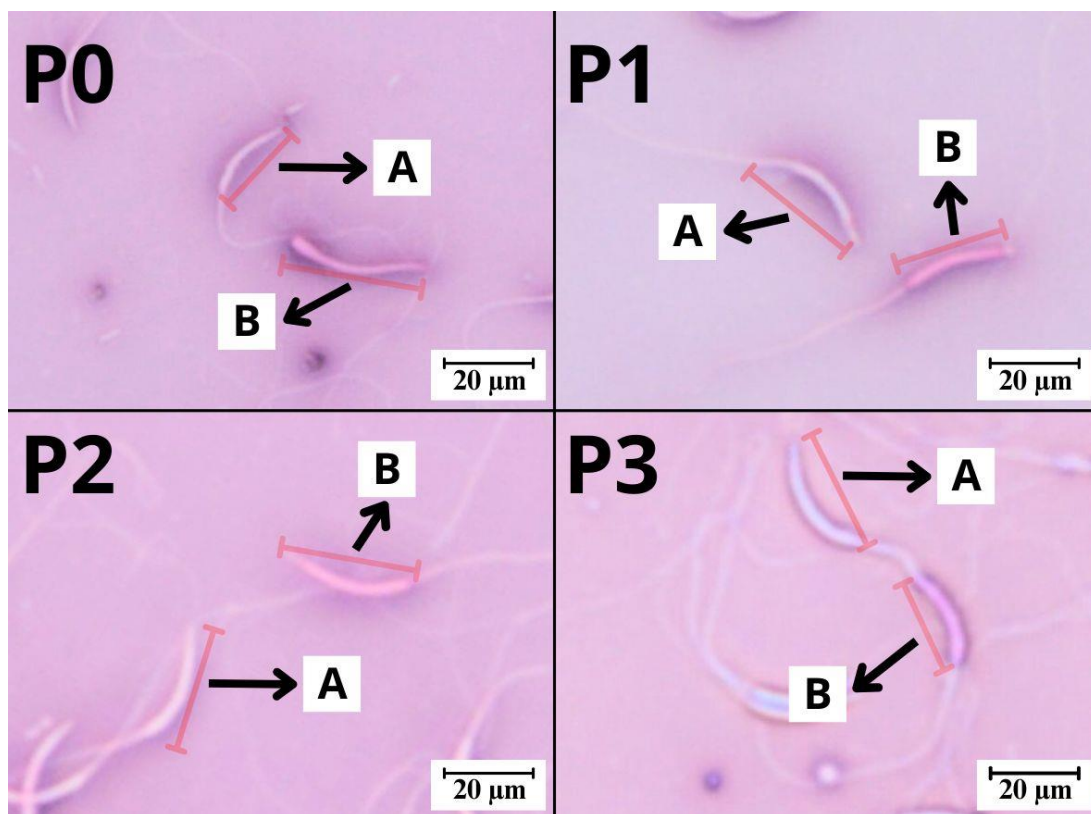
Proses pembekuan dalam penelitian ini menyebabkan penurunan motilitas, viabilitas, serta peningkatan abnormalitas spermatozoa, hal ini dapat berpengaruh pada keberhasilan fertilisasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa, motilitas spermatozoa sebelum pembekuan tidak menunjukkan pengaruh yang nyata, sementara pengaruh yang nyata teramati setelah pencairan (*thawing*)

(Tabel 1). Rata-rata motilitas spermatozoa sebelum pembekuan adalah 77-79% dan setelah pencairan adalah 20,5-34%. Hal ini selaras dengan laporan penelitian García *et al.* (2023) pada semen ikan *Sorubim cuspicaudus* yang menggunakan konsentrasi EG 6%, 8% dan 10%, bahwa rata-rata motilitas sebelum pembekuan adalah 33,8-61,0% dan setelah pencairan adalah 31,9-35,0%. Kerusakan pada membran plasma dan mitokondria dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa serta kadar Ade-nosin Trifosfat (ATP) setelah *thawing*, karena stres oksidatif berperan penting dalam kerusakan mitokondria (Chen *et al.*, 2017). Penelitian lain melaporkan bahwa konsentrasi EG 5% menunjukkan hasil yang paling tinggi ($36,83 \pm 1,26\%$) pada motilitas spermatozoa anjing setelah pencairan, dibandingkan dengan perlakuan gliserol 4%, 8% dan kombinasi gliserol 4% dengan EG 4% (Kusum *et al.*, 2023). Berat molekul EG yang rendah memengaruhi kemampuan masuknya senyawa tersebut ke dalam membran sel, perlindungan selama pembekuan, serta tingkat toksisitasnya (Santiani *et al.*, 2016). Viabilitas spermatozoa pada penelitian ini, baik sebelum pembekuan maupun setelah pencairan menunjukkan pengaruh yang nyata (Gambar 1). Khaeruddin *et al.* (2020) melaporkan bahwa rata-rata viabilitas spermatozoa ayam kampung setelah pencairan dengan konsentrasi EG 3%, 5% dan 7% adalah 27,0-29,9%. Sementara, pada penelitian ini memperoleh rata-rata viabilitas setelah pencairan yang lebih tinggi, yaitu 41,4-51,9%. Kriopreservasi dapat menyebabkan perubahan pH dan stres osmotik yang meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan menurunkan viabilitas setelah pencairan (Len *et al.*, 2019). Efektivitas tinggi yang diamati, dikaitkan dengan sifat EG sebagai krioprotektan intraseluler yang dapat masuk ke dalam sel. Namun, pergerakan air dan EG yang terlalu cepat keluar masuk sel dapat menimbulkan kejutan osmotik, yang berakibat pada kerusakan atau lisis membran sel selama pembekuan (Ozimic *et al.*, 2023). Pada penelitian ini menunjukkan adanya penurunan viabilitas setelah pencairan pada setiap perlakuan

Tabel 1. Kualitas semen ayam gaga sebelum pembekuan dan setelah pencairan yang telah diberikan Perlakuan

Perlakuan	Sebelum Pembekuan (%) <i>Before freezing (Bf)</i>			Setelah Pencairan (%) <i>After thawing (At)</i>		
	Motilitas (Bf)	Viabilitas (Bf)	Abnormalitas (Bf)	Motilitas (At)	Viabilitas (At)	Abnormalitas (At)
DMSO + 7%	77.50 ± 1.86 ^a	93.36 ± 1.03 ^{ab}	9.03 ± 0.88 ^a	34.00 ± 1.8 ^b	50.25 ± 0.39 ^b	21.56 ± 3.23 ^a
EYRL+EG 5%	79.00 ± 1.63 ^a	96.21 ± 0.62 ^b	7.52 ± 1.00 ^a	24.00 ± 1.00 ^a	51.91 ± 0.63 ^b	19.51 ± 2.90 ^a
EYRL+EG 7%	78.50 ± 1.07 ^a	93.33 ± 0.87 ^a	9.45 ± 1.22 ^a	20.50 ± 2.03 ^a	47.61 ± 2.32 ^{ab}	22.18 ± 2.80 ^a
EYRL+EG 9%	77.00 ± 2.13 ^a	92.62 ± 1.34 ^a	9.15 ± 0.77 ^a	21.50 ± 2.48 ^a	41.42 ± 3.78 ^a	23.65 ± 3.58 ^a

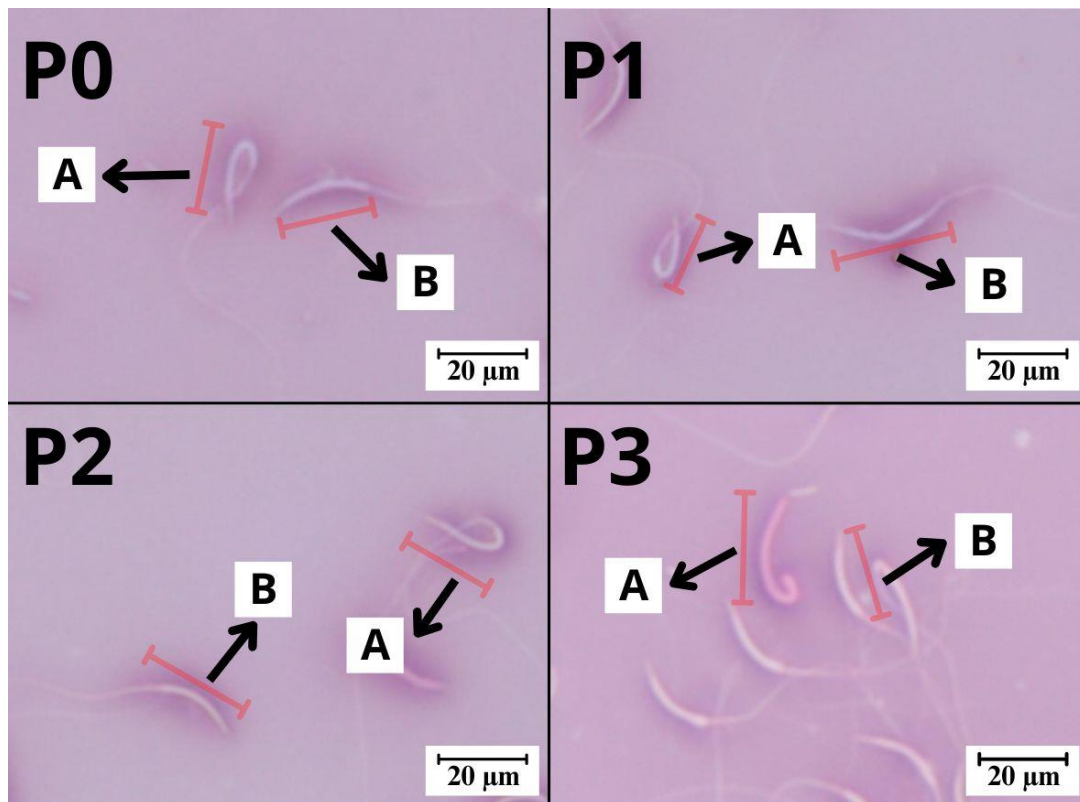
^{a,b}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (p < 0.05).



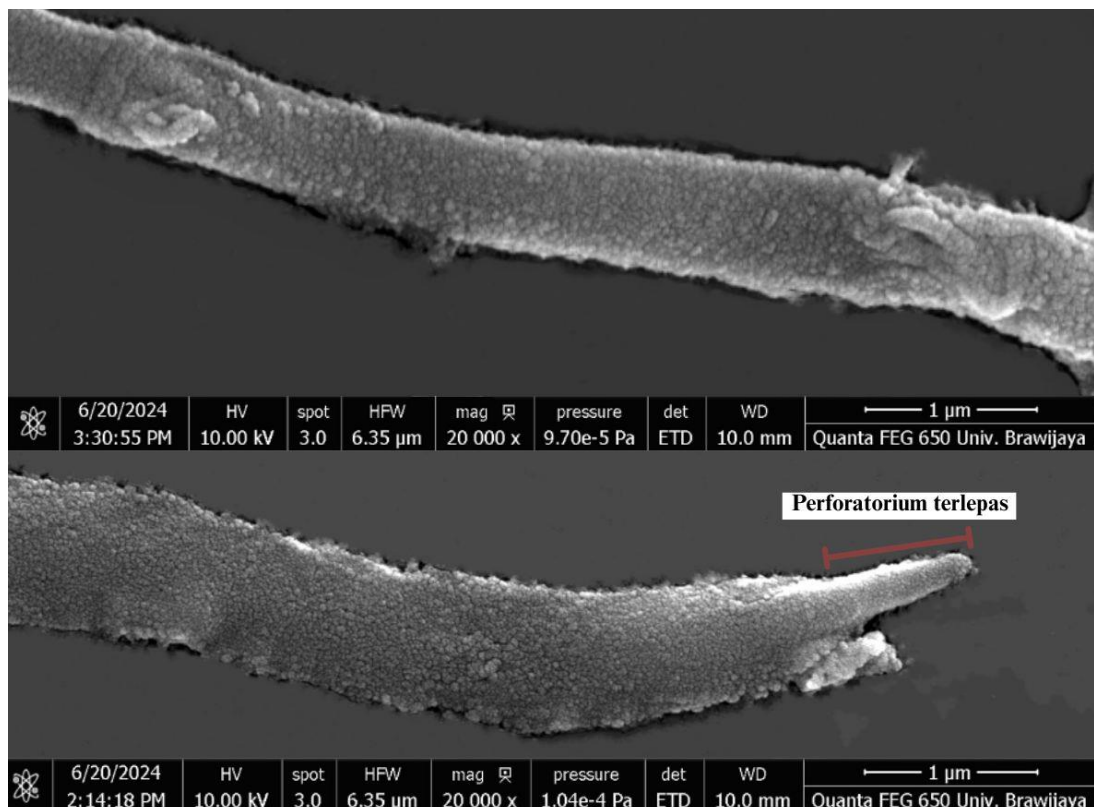
Gambar 1. Viabilitas spermatozoa ayam Gaga. a: spermatozoa hidup (tidak menyerap warna), b: spermatozoa mati (menyerap warna).

Tabel 2. Persentase *recovery rate*, penurunan viabilitas, dan peningkatan abnormalitas semen ayam gaga yang telah diberikan perlakuan

Perlakuan	Variabel (%)		
	<i>Recovery Rate</i>	Penurunan Viabilitas	Peningkatan Abnormalitas
DMSO + 7%	44.29 ± 3.00 ^b	43.11 ± 0.99 ^a	12.53 ± 2.90 ^a
EYRL + EG 5%	30.44 ± 1.28 ^a	44.31 ± 0.75 ^a	11.98 ± 2.50 ^a
EYRL + EG 7%	26.19 ± 2.62 ^a	45.72 ± 2.91 ^a	12.73 ± 2.19 ^a
EYRL + EG 9%	28.02 ± 3.26 ^a	51.20 ± 3.68 ^b	14.49 ± 3.50 ^a



Gambar 2. Abnormalitas spermatozoa ayam Gaga. a: spermatozoa abnormal, b: spermatozoa normal.



Gambar 3. Hasil analisis SEM sperma pasca-pencairan dengan krioprotektan etilen glikol pada perbesaran 20.000x. Bagian tengah sperma (atas) dan kepala (bawah).

Penurunan viabilitas tertinggi terjadi pada perlakuan EG 9% ($51,20 \pm 3,68$ %) dan terendah pada DMSO 7%, ($43,11 \pm 0,99$ %). Penggunaan EG tetap dapat digunakan sebagai krioprotektan pada kriopreservasi semen ayam gaga, tetapi laju pembekuan yang terlalu lambat atau terlalu cepat harus disesuaikan karena dapat menimbulkan efek yang merugikan. Senyawa EG juga lebih sensitif terhadap fluktuasi suhu sehingga memerlukan penyesuaian kecepatan pembekuan (Zong *et al.*, 2023). Tekanan osmotik sangat menentukan keberhasilan kriopreservasi karena memengaruhi keseimbangan cairan serta viabilitas spermatozoa selama proses pembekuan dan pencairan. Ketidakseimbangan tekanan osmotik dapat menyebabkan kerusakan atau bahkan kematian spermatozoa (Mughal *et al.*, 2018).

Hasil yang diperoleh dari evaluasi abnormalitas sebelum pembekuan dan setelah pencairan menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata (Gambar 2). Rata-rata abnormalitas spermatozoa sebelum pembekuan dalam penelitian ini berkisar antara 7,52–9,45%, relatif lebih rendah dibandingkan laporan 9,5–15,4% pada semen ayam kampung (Ardiansyah *et al.*, 2022) dan 13,01% pada semen ayam nunukan (Ardhani *et al.*, 2019). Pada penelitian ini terjadi adanya peningkatan abnormalitas setelah pencairan pada setiap perlakuan. Peningkatan abnormalitas terendah ditemukan pada perlakuan EG 5% ($11,98 \pm 2,50$ %) dan tertinggi pada EG 9% ($14,49 \pm 3,50$ %). Tingginya tingkat abnormalitas dapat memengaruhi fertilitas, hal ini sejalan dengan laporan Junaedi *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa tingkat kesuburan sangat berkorelasi dengan morfologi normal, karena spermatozoa abnormal lebih sulit untuk menembus zona pelusida oosit.

Semakin tinggi nilai *recovery rate* yang dihasilkan, semakin baik kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup dan tetap aktif setelah pencairan. *Recovery rate* tertinggi pada penelitian ini adalah $44,29 \pm 3,00$ % pada perlakuan DMSO 7% dan terendah $26,19 \pm 2,62$ % pada perlakuan EG 7% (Tabel 2). *Recovery rate* tersebut lebih

rendah dibandingkan laporan Mphaphathi *et al.* (2016) yang mengemukakan nilai 50,11% dan 49,02% pada perlakuan 8% DMSO dan EG, serta 23,75% dan 6,10% pada perlakuan 8% propanediol dan tanpa krioprotektan. *Recovery rate* yang rendah kurang optimal untuk suatu keberhasilan fertilisasi, kecuali dengan penggunaan jumlah spermatozoa yang sangat banyak atau penerapan inseminasi buatan secara intensif. Arif *et al.* (2025) melaporkan bahwa tingkat fertilisasi yang wajar dapat dicapai apabila motilitas spermatozoa setelah pencairan mencapai ≥ 40 %. Motilitas di bawah batas ini masih bisa dimanfaatkan dalam konteks terbatas, khususnya untuk tujuan konservasi genetik, tetapi kurang sesuai untuk inseminasi buatan secara komersial. Proses pembekuan dan pencairan seringkali menyebabkan perubahan morfologi, sementara peningkatan ROS selama kriopreservasi dapat berdampak negatif pada motilitas spermatozoa dan menghasilkan nilai *recovery rate* yang rendah (Khan *et al.*, 2021).

Pengamatan ultrastruktur spermatozoa memberikan gambaran lebih jelas mengenai kondisi permukaan spermatozoa setelah pencairan. Proses kriopreservasi dapat merusak spermatozoa, terutama pada bagian kepala, tengah dan ekor. Hasil pengamatan ultrastruktur pada penelitian ini disajikan pada Gambar 3, bahwa terdapat kepala spermatozoa dengan akrosom yang hilang. Hal ini menandakan terjadinya kerusakan pada akrosom selama pembekuan, sementara bagian tengahnya masih tampak utuh. Hal tersebut membuktikan bahwa penggunaan EG sebagai krioprotektan terbukti membantu mengurangi kerusakan pada spermatozoa. Hasil ini sejalan dengan analisis ultrastruktur sebelumnya pada spermatozoa ayam gaga yang dikriopreservasi menggunakan DMSO 7%, dilaporkan adanya kerusakan pada bagian ekor, seperti terbelah dan melengkung (Khaeruddin, 2024b), serta distribusi yang tidak merata pada membran plasma dan mitokondria (Chen *et al.*, 2024). Bagian tengah spermatozoa mengandung mitokondria yang berperan penting dalam metabolisme energi yang diperlukan untuk

motilitas progresif spermatozoa (Sangani *et al.*, 2017). Spermatozoa unggas diketahui memiliki proporsi asam lemak tak jenuh ganda dalam membran plasma yang lebih tinggi dibandingkan beberapa spesies mamalia (Najafi *et al.*, 2020). Spermatozoa unggas memiliki tingkat ketahanan yang lebih rendah dibandingkan spermatozoa mamalia selama kriopreservasi karena rasio luas permukaan spermatozoa unggas terhadap volumenya cenderung lebih kecil. Kombinasi *Egg Yolk Ringer's Lactate*. (EYRL) dan EG terbukti mampu mempertahankan integritas membran karena berfungsi sebagai krioprotektan sekaligus antioksidan. Membran plasma berperan sebagai penghalang semipermeabel yang melindungi organel sel seperti akrosom, inti dan mitokondria dari kerusakan akibat faktor eksternal (Ray *et al.*, 2016). Oleh karena itu, integritas membran plasma sangat penting untuk menjaga kelangsungan hidup serta fungsi spermatozoa setelah proses kriopreservasi.

SIMPULAN

Motilitas spermatozoa sebelum pembekuan, abnormalitas sebelum pembekuan dan setelah pencairan menunjukkan hasil tidak berpengaruh nyata, sedangkan motilitas setelah pencairan, viabilitas sebelum pembekuan dan setelah pencairan menunjukkan hasil berpengaruh nyata. Hasil ini menunjukkan bahwa DMSO merupakan krioprotektan yang lebih efektif dalam menjaga integritas fungsional spermatozoa ayam gaga setelah pencairan dibandingkan EG. Pengamatan ultrastruktural menunjukkan bahwa spermatozoa ayam yang telah melewati kriopreservasi mengalami kehilangan akrosom di bagian kepala, yang menandakan kerusakan akrosom selama pembekuan, sementara bagian tengah tetap utuh.

SARAN

Penggunaan EG dengan dosis 5%, 7% dan 9% sebagai krioprotektan semen ayam gaga menunjukkan hasil yang masih

kurang optimal. Diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan kadar EG yang berbeda atau menggunakan krioprotektan jenis lain agar diperoleh kualitas semen beku ayam gaga yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi atas pemberian hibah Guru Besar dengan Nomor kontrak 4138.5/UN10.F05/PN/2024, yang diberikan kepada Prof. Dr. Ir. Sri Wahjuningsih, M.Si. untuk penelitian berjudul: Evaluasi Pengaruh Perbedaan Waktu Ekuilibrasi dan Pencairan terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Gaga.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardhani F, Manullang JR, Boangmanalu BM. 2019. Abnormalitas morfologi spermatozoa ayam nunukan asal ejakulat. *Jurnal Pertanian Terpadu* 7(1): 122-130
- Ardiansyah MAN, Saleh DM, Hidayat NM. 2022. Pengaruh lama penyimpanan semen ayam kampung pada suhu 5°C terhadap abnormalitas spermatozoa dan fertilitas telur hasil inseminasi buatan dengan ayam niaga petelur. *Journal of Animal Science and Technology* 4(2): 277-284
- Arif A, Zahoor N, Tang J, Tang M, Dong L, Khan SZ, Dai G. 2025. Cryopreservation strategies for poultry semen: A comprehensive review of techniques and applications. *Veterinary Sciences* 12(2): 145-170
- Azizah N, Komarudin K, Pratiwi N, Kosta - man T, Sartika T. 2023. Analisis kualitas semen ayam lokal indonesia berdasarkan galur dan umur dewasa kelamin yang berbeda. *Jurnal Agripet* 23(1): 40-45
- Best BP. 2015. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research* 18(5): 422-436
- Bhattacharya S, Prajapati BG. 2016. A revi-

- ew on cryoprotectant and its modern implication in cryonics. *Asian Journal of Pharmaceutics* 10(3): 154-159
- Blesbois E. 2018. Bird reproduction over - view. In: Skinner MK. (ed). *Encyclopedia of Reproduction*. Cambridge. Academic Press. Volume 6. Hlm. 579-585
- Chen B, Li S, Yan Y, Duan Y, Chang S, Wang H, Ji W, Wu X, Si W. 2017. Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm with glycerol and ethylene glycol and its effect on sperm-specific ion channels-CatSper and Hv1. *Theriogenology* 104(1): 37-42
- Chen X, Liu J, Liu Y, Li X, An D, Liu X, Zhang L. 2024. Alpha-lipoic acid improves cryopreservation of rooster semen by reducing oxidative stress. *Poultry Science* 103(5): 103632
- Cordeiro RM, Stirling S, Fahy GM, de Magalhães JP. 2015. Insights on cryoprotectant toxicity from gene expression profiling of endothelial cells exposed to ethylene glycol. *Cryobiology* 71(3): 405-412
- Darsini N, Hamidah B, Suyono SS, Ashari FY, Aswin RH, Yudiwati R. 2019. Human sperm motility, viability, and morphology decrease after cryopreservation. *Folia Medica Indonesiana* 55(3): 198-201
- Dietrich MA, Arnold GJ, Fröhlich T, Otte KA, Dietrich GJ, Ciereszko A. 2015. Proteomic analysis of extracellular medium of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio* L.) semen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D* 15(1): 49-57
- García VA, Izquierdo DP, González JR, Guevara MP, Carrasco SP, Araujo JE. 2023. Damage to *Sorubim cuspidus* sperm cryopreserved with ethylene glycol. *Animals* 13(2): 235-246
- Hidayat N, Sumantri C, Afnan R, Arifiantini RI. 2016. Determination of Sodium Dodecyl Sulfate Concentration in Ringer's Lactate-Egg Yolk Extender for Pelung Rooster Semen Preservation. *Journal of Veterinary Sciences* 10(2): 170-174
- Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. 2017. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research* 6(1): 12-18
- Junaedi, Arifiantini RI, Sumantri C, Gunawan A. 2016. The use of dimethyl sulfoxide as cryoprotective agent for native chicken frozen semen. *Jurnal Veteriner* 17(2): 300-308
- Khaeruddin K, Junaedi, Hastuti. 2020. Cryopreservation of Indonesian native chicken semen by using dimethyl sulfoxide and various level of ethylene glycol as cryoprotectants. *Biodiversitas* 21(12): 5718-5722
- Khaeruddin K, Kurniawan ME. 2020. Keberhasilan pembekuan semen ayam yang diencerkan dan diperkaya dengan glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa. *Jurnal Veteriner* 21(3): 476-484
- Khaeruddin K, Wahjuningsih S, Ciptadi G, Yusuf M, Hermawansyah H, Sahiruddin S. 2022. Cryopreservation of Gaga' chicken semen from South Sulawesi, Indonesia with the addition of L-carnitine, hyaluronic acid, sucrose and their combination in diluent. *Biodiversitas* 23(6): 3297-3302
- Khaeruddin K. 2024. Analisis kalsium intraseluler dan ultrastruktur spermatozoa ayam yang dibekukan. *Tarjih Tropical Livestock Journal* 4(2): 126-138.
- Khan IM, Cao Z, Liu H, Khan A, Rahman SU, Khan MZ, Sathanawongs A, Zhang Y. 2021. Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Frontiers in Veterinary Science* 8(1): 1-14
- Kudratullah, Sudrajat AS. 2021. Motilitas, viabilitas, dan morfologi spermatozoa ayam bangkok dengan pengencer dextrose dan NaCl fisiologis 10% pada penyimpanan suhu 5°C dan 26°C. *Indonesian Journal of Applied Science and Technology* 2(1): 1-9

- Kusum K, Roy R, Sharma VB, Mishra RP, Singh N. 2023. Cryoprotective activity of glycerol and ethylene glycol: dynamics with canine sperm integrity. *Indian Journal of Animal Research* 57(9): 1133-1138
- Len JS, Koh WSD, Tan SX. 2019. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports* 39(8): BSR20191601
- Madeddu M, Mosca F, Sayed AA, 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. *Animal Reproduction Science* 171(1): 58-64
- Mavi GK, Dubey PP, Cheema RS, Dash SK, Bansal BK. 2019. Comparative analysis of semen quality parameters and their relationship with fertility in different genetic groups of layer chicken. *Indian Journal of Animal Research* 53(10): 1269-1274
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* 73(3): 343-347
- Mphaphathi ML, Seshoka MM, Luseba D, Sutherland B, Nedambale TL. 2016. The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 5(2): 132-139
- Mughal DH, Ijaz A, Yousaf MS, Wadood F, Farooq U, Mahmood SA, Riaz A. 2018. Effect of osmotic pressure on spermatozoa characteristics of cryopreserved buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. *Journal of Applied Animal Research* 46(1): 274-277
- Naidu KT, Prabhu NP. 2022. An able cryo-protectant and a moderate denaturant: distinctive character of ethylene glycol on protein stability. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 40(2): 820-832
- Najafi A, Daghigh-Kia H, Dodaran HV, Mehdipour M, Alvarez-Rodriguez M. 2017. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 177(1): 35-41
- Najafi A, Kia HD, Mehdipour M, Hamishehkar H, Álvarez-Rodríguez M. 2020. Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. *Theriogenology* 152: 122-128
- Ozimic S, Ban-Frangez H, Stimpfelpfel M. 2023. Sperm cryopreservation today: , efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology* 45(6): 4716-4734
- Ray S, Kassin A, Busija AR, Rangamani P, Patel HH. 2016. The plasma membrane as a capacitor for energy and metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 310(3): 181-192
- Sangani AK, Masoudi AA, Torshizi RV. 2017. Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow-and fast-growing roosters. *Poultry Science* 96(1): 211-219
- Santiani A, Evangelista-Vargas S, Vargas S, Gallo S, Ruiz L, Orozco V, Rosemberg M. 2016. Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *Andrologia* 49(6): 1-3.
- Sun Y, Xue F, Li Y, Fu L, Bai H, Ma H, Xu S, Chen J. 2019. Differences in semen quality, testicular histomorphology, fertility, reproductive hormone levels and expression of candidate genes according to sperm motility in Beijing-You chickens. *Poultry Science* 98(9): 4182-4189
- Svoradová A, Kuželová L, Vašíček J, Baláži A, Hanusová E, Chrenek P. 2017. *In vitro* effect of various cryoprotectants on the semen quality of endangered Oravka chicken. *Zygote* 26(1): 33-39

- Thélie A, Bailliard A, Seigneurin F, Zerjal T, Tixier-Boichard M, Blesbois E. 2019. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poultry Science* 98(1): 447-455
- Wahjuningsih S, Arif AA, Khaerudin K, Putri ARI. 2024. The effects of equilibration time and post-thawing temperatures in cryopreservation of gaga chicken semen. *Advanced in Animal and Veterinary Sciences* 12(5): 807-814
- Wahjuningsih S, Arif AA, Putri ARI, Khaerudin K, Syahrani SM. 2024. Supplementation of CoQ10 on LREY Diluent in Gaga Chicken Semen After Cryopreservation. *International Journal of Agriculture and Biology* 32(6): 618-622
- Wahjuningsih S, Khaeruddin K, Pratiwi H, Sari APZNL, Tribudi YA, Arif AA, Kostaman T. 2025. The use of combined ringer diluent on calcium concentration, malondialdehyde levels, and ultrastructure of Gaga chicken'sperm post-freezing. *Italian Journal of Animal Science* 24(1): 754-762
- Woli SL, Kusumawati ED, Krisnaningsih ATN. 2017. Motilitas dan viabilitas spermatozoa ayam kampung pada suhu 5°C menggunakan pengencer dan lama simpan yang berbeda. *Jurnal Sains Peternakan* 5(2): 138-144
- Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GM, Ma T, Chen J. 2023. Chicken sperm cryopreservation: review of techniques, freezing damage, and freezability mechanisms. *Agriculture* 13(2): 445-461