

**LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI  
(HB VIII/2)  
Tahun Anggaran 2000/2001**

**EFEKTIVITAS KRIOPROTEKTAN DAN EVALUASI  
KUALITAS SPERMATOZOA HASIL KRIOPRESERVASI  
SEBAGAI KONTRIBUSI POTENSIAL PRESERVASI  
GENETIK AYAM HUTAN HIJAU (*Gallus varius*) YANG  
DITANGKARKAN**

**Prof.Dr. Reviary Widjajakusuma  
Dr. Iman Supriatna  
Drh. D.Rita Ekastuti, MS  
Drh. Nia Nurdiani, MS**



**Dibiayai oleh Proyek: Peningkatan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat  
Kontrak No.: 011/P2IPB/HB/VI/2000, Tanggal 15 Mei 2000  
Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat  
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi  
Departemen Pendidikan Nasional**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
2001**

## LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Efektivitas Krioprotektan dan Evaluasi Kualitas Spermatozoa Hasil Kriopreservasi Sebagai Kontribusi Potensial Preservasi Genetik Ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) yang Ditangkarkan
2. Ketua Peneliti
- Nama : Prof.Dr. Reviany Widjajakusuma  
Jenis kelamin : Perempuan  
Pangkat/Golongan/NIP : Guru Besar Madya/IVd/130227810  
Bidang Keahlian : Endokrinologi  
Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan/Fisiologi dan Farmakologi  
Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

### 3. Tim Peneliti

No.	Nama Lengkap	Bidang Keahlian	Fakultas	Perguruan Tinggi
1.	Prof.Dr. Reviany Widjajakusuma	Endokrinologi	Kedokteran Hewan	IPB
2.	Dr. Iman Supriatna	Reproduksi	Kedokteran Hewan	IPB
3.	Drh. D.Rita Ekastuti, MS	Zoofisiologi	Kedokteran Hewan	IPB
4.	Drh. Nia Nurdiani, MS	Fisiologi Hewan	MIPA	UNPAK

### 3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 (dua) tahun  
Biaya total yang diusulkan : Rp. 80.000.000,00  
Biaya yang disetujui tahun 2000/2001 : Rp. 28.000.000,00

Bogor, 26 Maret 2001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Institut Pertanian Bogor

  
Dr. Fachriyan Hasmi Pasaiibu  
NIP 130701878



Peneliti Utama,



Prof.Dr. Reviany Widjajakusuma  
NIP 130227810

Mengetahui,

Ketua Lembaga Penelitian  
Institut Pertanian Bogor

Dr. Ir. Aunuddin, M.Sc.  
NIP 130354141

## RINGKASAN

**EFEKTIVITAS KRLOPROTEKTAN DAN EVALUASI KUALITAS SPERMATOZOA HASIL KRIOPRESERVASI SEBAGAI KONTRIBUSI POTENSIAL PHESERVASI CENETIK AYAM HUTAN HIJAU (*Gallus varius*) YANG DITANGKARKAN (Reviany Widjajakusuma\*, Iman Supriatna\*\*, D. Rita Ekastuti\*, Nia Nurdiani\*\*\*, 2000, xiii+ 34 halaman)**

Aplikasi teknik pembekuan semen menggunakan metoda kriopreservasi, sampai saat ini yang telah rutin dipakai yaitu pada semen sapi dan pada pemakaian terbatas pada domba dan kambing. Pada pembekuan semen unggas baru tahap penelitian yaitu ayam Lokal dan burung puyuh, sedangkan khusus ayam hutan belum pernah dilakukan. Pembekuan semen ruminansia yang biasa menggunakan krioprotektan gliserol. Dari hasil penelitian pembekuan semen ayam menggunakan gliserol, walaupun hasil pencairannya menunjukkan kualitas semen yang baik tetapi kemampuan fertilisasi rendah. Untuk itu khusus pembekuan semen unggas diperlukan krioprotektan tertentu yang tidak sama dengan ruminansia.

Ethylene glycol (EG) dan DMSO dapat disarankan untuk dipakai sebagai krioprotektan dalam pembekuan semen ayam Hutan Hijau. Konsentrasi krioprotektan yang dipakai dalam percobaan berdasar konsentrasi krioprotektan dalam pembekuan semen ayam Lokal. Walaupun semen ayam Hutan Hijau telah dapat dibekukan dalam EG atau DMSO dengan konsentrasi 6%, akan tetapi konsentrasi yang optimal, efektif, efisien dan ekonomis masih belum diketahui. Selain itu kerusakan yang ditimbulkan dalam proses pembekuan baru diketahui hanya melalui pemeriksaan morfologi menggunakan mikroskop cahaya yang hasilnya dapat dilihat berupa abnormalitas spermatozoa. Kerusakan yang lebih rinci dalam tingkat ultrastruktur spermatozoa dapat terjadi dan perlu diperiksa menggunakan teknik elektron mikroskopik (*scanning electron microscope*, SEM).

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mendapatkan metode pembekuan semen ayam Hutan Hijau dengan penekanan memilih jenis/macam krioprotektan yang cocok dan menentukan konsentrasinya yang tepat. Diharapkan semen beku ayam, yang telah dicairkan kembali memiliki kualitas yang tinggi dan laik inseminasi dengan motilitas, morfologis, viabilitas dan kemampuan fertilisasi yang tinggi. Pemeriksaan dan pengkajian mengenai morfologis spermatozoa beku

dilakukan sampai tingkat ultrastruktur sel untuk mengetahui kerusakan spermatozoa secara rinci akibat proses kriopreservasi.

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian pembekuan semen adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 2x3 dengan dua faktor yaitu jenis krioprotektan (EG dan DMSO) dan faktor konsentrasi (4,6 dan 8%), sehingga didapatkan enam kombinasi perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali ulangan dan setiap ulangan dilakukan pemeriksaan tiga kali (triplo). Data dianalisis menggunakan sidik ragam (Anova) searah dan dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel and Torrie 1993). Selain itu untuk mengetahui dosis yang tidak teruji disidik dengan analisa perbandingan arah yang dikenal dengan metoda polinomial. Pengolahan data menggunakan komputer dengan program Minitab versi 11.

Semen yang dipakai dalam penelitian merupakan gabungan ejakulat dari ayam Hutan Hijau yang telah diinduksi dengan 40 IU PMSG i.m. Kualitas semen segar tersebut memiliki karakteristik, volume ejakulat  $0,014 \pm 0,001$  ml, berwarna putih susu, kental, pH  $7,27 \pm 0,018$  dan secara mikroskopik menunjukkan gerakan massa (+), motilitas  $87,86 \pm 1,01\%$ , konsentrasi  $3,036 \pm 0,225$  milyar spermatozoa per ml dengan abnormalitas  $10,471 \pm 0,479\%$ .

Motilitas semen beku ayam Hutan Hijau yang telah dicairkan memiliki selang nilai yang secara empiris terendah terjadi pada spermatozoa dalam 8% DMSO (36,11%) dan tertinggi dalam 6% EG (56,11%). Sedangkan abnormalitas terendah terdapat pada spermatozoa yang dibekukan dalam 6% EG (18,52%) dan tertinggi terjadi pada 8% DMSO (28,12%). Viabilitas *in vitro* selama dua jam pada suhu 37°C, spermatozoa yang dibekukan dalam 8% hanya mencapai 2,22% dan yang tertinggi terdapat pada semen yang dibekukan dalam 4% EG yaitu mencapai 8,33%. Semen yang telah dibekukan pada suhu -196°C dan dicairkan kembali, mengalami penurunan motilitas sekitar 13,89 sampai dengan 31,67% disertai dengan peningkatan kerusakan spermatozoa akibat pembekuan (abnormalitas) dengan kisaran 7,18 sampai dengan 15,65%. Penurunan motilitas dan peningkatan abnormalitas karena proses pembekuan dan pencairan kembali terjadi paling drastis dan tertinggi terjadi dalam semen yang dibekukan dalam 8% DMSO dan berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ), baik diantara perlakuan semua konsentrasi (4,6 atau 8%) maupun krioprotektan EG atau DMSO. Dalam penentuan dosis, menggunakan metoda polinomial diperoleh persamaan

fungsi untuk penentuan konsentrasi krioprotektan EG adalah:  $Y = -2,775X^2 + 10,545X + 46$ , sedangkan untuk konsentrasi DMSO mempunyai persamaan fungsi  $Y = -10,28X^2 + 32,51X + 31,1$ . Peubah tidak bebas Y adalah motilitas spermatozoa pascapencairan dan X adalah peubah bebas untuk konsentrasi krioprotektan EG atau DMSO.

Hasil penelitian sementara menunjukkan bahwa, kedua jenis krioprotektan baik EG maupun DMSO dapat dipakai untuk pembekuan semen ayam Hutan Hijau. Konsentrasi EG yang dapat dipakai untuk pembekuan 4, 6 atau 8%, sedangkan DMSO sebaiknya 4 atau 6%. Ethylene glycol (EG) pada taraf konsentrasi 4,6 dan 8% dapat berfungsi sebagai krioprotektan dalam pembekuan dan tidak bersifat toksik terhadap sel spermatozoa. Demikian pula DMSO pada taraf 4 dan 6% dapat dipakai sebagai krioprotektan akan tetapi pada taraf 8%, DMSO menunjukkan efek toksiknya terhadap viabilitas spermatozoa pada suhu 37°C.

Pada pemeriksaan morfologis pascapencairan menggunakan SEM, sperma yang dibekukan baik dengan DMSO maupun EG, secara umum menunjukkan kerusakan di bagian leher, ekor putus, sebagian terputus dari bagian tengah ekor (*midpiece*), membran plasma ekor sobek dan sebagian terlepas, kepala sperma membengkak, membran akrosom rusak/sobek dan lepas atau bahkan seluruh bagian akrosom lepas dari bagian ujung anterior kepala sperma.

---

(\*Staf Dosen Bagian Fisiologi dan Farmakologi, \*\*Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor dan \*\*\*Staf Dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan. Kontrak No.: 011/P21PB/HB/VI/2000)

## SUMMARY

### **EFFECTIVITY OF CRYOPROTECTANTS AND EVALUATION OF FROZEN SPERM QUALITY AS A CONTRIBUTION ON GENE POOL PRESERVATION OF CAPTIVE PROPAGATED GREEN JUNGLE FOWLS (*CALLUS VARIUS*).**

**(Reviany Widjajakusuma\*, Iman Supriatna\*\*, D. Rita Ekastuti\*, Nia Nurdiani\*\*\*, 2000, xiii + 34 pages)**

The application of frozen sperm technique using the cryopreservation method has been widely used for cow sperm and to a certain extent in sheep and goats. Studies on frozen sperm in poultry are very limited, mostly in Local fowl and quails, however, no study of this sort has ever been conducted in the Green jungle fowl. The common cryoprotectant for frozen ruminant sperm is glycerol. Procedures using glycerol for freezing poultry sperm resulted in good sperm quality after thawing, however, with low fertilizing capacity. For these reasons it is necessary to investigate *the* most suitable cryoprotectant for freezing poultry semen.

From previous experience with frozen Local fowl sperm 6% ethylene glycol (EG) or dimethylsulphoxide (DMSO) could be utilized as cryoprotectants for freezing Green Jungle fowl sperm, however, the optimal concentration, effectivity, efficiency and economically, remains to be investigated. The morphological damage, resulted by the freezing process as indicated by sperm abnormalities has only been observed by light microscopy. More detailed study on the sperm freeze thaw damage should be explored by using the electron microscopy.

This experiment has been conducted to obtain a method for Green Jungle fowl frozen sperm, by selecting the most suitable cryoprotectant with optimal concentration. The frozen-thawed semen should possess high quality suitable for AI with high motility, morphology, viability and fertilizing capacity. Observation and more detailed study on the ultrastructure of frozen sperm should be conducted to determine the sperm freeze-thaw damage.

The factorial (2x3) completely randomized design was used with 2 factors (EG and DMSO) and 3 levels of concentration (4, 6 and 8%) and 3 times replications. Data were analyzed using the analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan multiple range test.

Semen was collected and pooled from Green Jungle fowls induced with 40 IU PMSG i.m. Fresh semen quality possesses the following characteristics: ejaculate volume

of  $0.014 \pm 0.001$  ml, milky colour, viscous, pH  $7.27 \pm 0.018$  and microscopically showed mass movement of (+), motility  $87.86 \pm 1.01\%$ , concentration  $3.036 \pm 0.225$  billions sperm per ml and  $10.471 \pm 0.479\%$  abnormality.

Frozen-thawed semen motility of the Green Jungle fowl is empirically lowest from spermatozoa in 8% DMSO (36.11%) and highest in 6% EG (56.11%). Lowest abnormality was found in spermatozoa frozen in 6% EG (18.50%) and highest in 8% DMSO (28.12%). Viability *in vitro* during 2 hours at 37°C was 2.22% from spermatozoa frozen in 8% DMSO and highest 8.33% in 4% EG. Frozen-thawed semen decrease motility from 13.89% to 31.67% with abnormality ranging from 7.18% to 15.65%. The decrease in motility and increase in abnormality of frozen-thawed spermatozoa was resulted in semen frozen in 8% DMSO and differ significantly ( $P < 0.01$ ), either between all concentrations (4, 6 and 8%) or cryoprotectants EG or DMSO

Using the polynomial method in the doses determination, the equation for EG is  $Y = -2.775X^2 + 10.545X + 46$ , while the equation for DMSO is  $Y = -10.28X^2 + 32.51X - 31.1$ . The Y axis denotes the post-thaw sperm motility and the X axis denotes the EG or DMSO concentrations.

The results show that either EG or DMSO could be used as cryoprotectants for Green Jungle fowl. Ethylene glycol (EG) at concentrations of 4, 6 and 8% could be used safely as cryoprotectant. Dimethylsulphoxide (DMSO) could only be used safely at concentration of 4 and 6%, while 8% DMSO shows toxic effects to sperm viability at 37°C.

---

Faculty Staff from the \*Department of Physiology and Pharmacology, \*\*Department of Reproduction and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University and \*\*\* Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, Pakuan University. Contract No.: 011/P2IPB/HB/VI/2000)

## PRAKATA

Untuk mempertahankan keanekaan ekosistem, jenis dan genetik satwa terutama jenis **satwa langka**, perlu adanya usaha konservasi baik secara *in-situ* maupun *ex-situ*. Usaha-usaha konservasi membutuhkan teknologi konservasi yang didukung oleh iptek terapan. Salah satu iptek terapan di bidang reproduksi yaitu pembekuan semen, inseminasi dan induksi ovulasi, telah terbukti dapat dipakai dalam peningkatan produktivitas industri peternakan dan pelestarian plasma nutfah ternak bernilai ekonomis. Teknologi reproduksi terapan tersebut dapat juga dimanfaatkan sebagai alat bantu atau metoda dalam usaha konservasi dan pelestarian satwa ayam Hutan Hijau yang terancam punah.

Laporan hasil penelitian tahun 2000/2001 ini merupakan informasi dan data kegiatan kerja percobaan pemilihan salah satu jenis krioprotektan terbaik dan penentuan taraf konsentrasi optimal untuk pembekuan semen ayam Hutan Hijau. Di tahun pertama 1999/2000, penelitian dilakukan dalam upaya meningkatkan produksi semen segar yang berkualitas dan tahun kedua 2000/2001 merintis pembentukan bank gen melalui pembekuan semen ayam Hutan Hijau, yang disimpan dalam nitrogen cair bersuhu  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Sehubungan dengan telah terlaksananya penelitian di tahun pertama ini patut diucapkan terma kasih kepada Pimpinan Proyek Peningkatan dan Pengabdian Pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, beserta Staf; dan Ketua Lembaga Penelitian, LPB. Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan (FKH), Ketua Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Ketua Bagian Fisiologi dan Farmakologi yang telah memberi ijin pelaksanaan penelitian dan mendukung pengembangan iptek serta staf pengajarnya. Suatu hal yang tidak dapat dilupakan, kepada mahasiswa FKH, Saudara Samuil bin Mopun dan Saudara Christian Bernard S., yang telah banyak membantu dalam penampungan semen, diucapkan terima kasih. Demikian pula kepada teknisi laboratorium Bagian Reproduksi dan Kebidanan Saudara Bondan yang telah banyak membantu dalam evaluasi dan pembekuan semen, dan staf pemelihara ayam Hutan Hijau di Bagian Fisiologi dan Farmakologi, tim peneliti mengucapkan terima kasih. Tanpa dukungan dan kerjasama semua pihak, sangat sulit penelitian ini dapat terlaksana.

Sebenarnya suatu penelitian yang baru selesai dikerjakan, merupakan awal bagi penelitian lainnya. Penelitian tidak pernah akan berakhir dan selalu menimbulkan banyak lagi pertanyaan yang memerlukan jawaban melalui penelitian lanjutannya. Begitu pula penelitian ini masih memerlukan kaji ulang agar mendapatkan hasil yang komprehensif dan komparatif yang sempurna sehingga dapat bermanfaat bagi pengembangan iptek dan masyarakat banyak pada umumnya.

Bogor, Maret 2001

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN DAN <i>SUMMARY</i> .....	ii
PRAKATA.....	vii
DAFTAK ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
I. PENDAHULUAN.....	1
II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	3
III. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
IV. MATERI DAN METODE PENELITIAN .....	9
4.1 Materi.....	9
4.1.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	9
4.1.2 Hewan Percobaan.....	9
4.1.3 Bahan dan Peralatan.....	9
4.3 Desain dan Metoda Penelitian.....	10
4.2.1 Penyediaan Larutan Krioprotektan.....	10
4.2.2 Penarnpungan Semen Segar.....	10
4.2.3 Pemeriksaan dan Evaluasi Semen Segar.....	12
4.2.4 Pembekuan (Kriopreservasi) Semen Ayam Hutan Hijau.....	12
4.2.5 Evaluasi Semen Beku Ayam Hutan Hijau.....	13
4.2.6 Prosedur Kerja Metoda Pemeriksaan dan Evaluasi Semen.....	13
4.2.7 Rancangan Penelitian dan Analisis Data.....	15
V. HASLL DAN PEMBAHASAN.....	17
5.1 Semen Ayam Hutan Hijau ( <i>Gallus varius</i> ) yang Dipakai Dalam Penelitian dan Persyaratan Kelaikan Beku.....	17
5.2 Proses Pendinginan, Ekuilibrasi dan Pembekuan.....	18
5.3 Motilitas dan Morfologis Spermatozoa Ayam Hutan Hijau Pada Tahap Pascaekuilibrasi dan Pencairan Kembali.....	20
5.4 Viabilitas Spermatozoa Beku Pascapencairan.....	23
5.5 Penentuan Dosis Optimal Krioprotektan EG dan DMSO.....	27
5.6 Efektivitas Krioprotektan EG dan DMSO dalam Proses Kriopreservasi.....	30

VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
6.1 Kesimpulan.....	33
6.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	37

## DAFTAR TABEL

No-	Teks	Halaman
1.	Komposisi formula larutan pengencer BPSE (Bootwalla and Miles 1992) yang dipakai sebagai medium dasar pembuatan larutan krioprotektan.....	11
2.	Karakteristik kualitas semen segar ayam Hutan Hijau ( <i>Gallus varius</i> ) yang dipakai dalam penelitian.....	18
3.	Rataan motilitas komparatif spermatozoa dari ayam Hutan Hijau yang dibekukan dengan krioprotektan EG dan DMSO dalam konsentrasi 4, 6 dan 8% pada tahapan prosedur pembekuan.....	21
4.	Rataan persentase abnormalitas spermatozoa dalam berbagai konsentrasi EG dan DMSO pada tahapan proses pembekuan.....	22
5.	Daya tahan hidup (viabilitas) spermatozoa beku pasca-pencairan pada suhu 37°C.....	27

## DAFTAR GAMBAR

No.	Teks	Halaman
1.	Alur kegiatan prosedur kerja proses pembekuan semen ayam Hutan Hijau yang dikemas dalam jerami plastik.....	16
2.	Sperma ayam yang dibekukan dalam 8% DMSO, terlihat abnormalitas spermatozoa pascapencairan berupa pengerutan kepala, sebagian kepala putus, ekor putus dan adanya pembengkakan bagian leher spermatozoa.....	24
3.	Semen ayam yang dikriopreservasi dalam 4% EG, terlihat kerusakan spermatozoa berupa penggelungan ekor ( <i>coiled</i> ), leher bengkok ( <i>bent</i> ), kepala sperma membengkak disertai penimbunan cairan dibagian post-akrosom (eosin intensif).....	24
4.	Akrosom sperma beku yang mengalami kerusakan pada membran plasma pembungkusnya atau membran plasma akrosom telah terlepas (SEM pembesaran 10.000 x).....	25
5.	<i>Scanning electron micrograph</i> sperma ayam Hutan Hijau yang dibekukan dalam DMSO (Pembesaran 5.000 x).....	25
6.	Mikrofotografi SEM pada pemeriksaan sperma beku ayam Hutan Hijau yang dibekukan dengan EG (Pembesaran 10.000 x).....	26
7.	Profil komparatif motilitas dan abnormalitas spermatozoa ayam Hutan Hijau ( <i>Gallus varius</i> ) dalam berbagai konsentrasi krioprotektan EG dan DMSO pada tahap pascaekuilibrasi dan pascapencairan kembali.....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Spesifikasi rataan kualitas semen ayam Hutan Hijau hasil penampungan dari kelompok perlakuan yang mendapat penyuntikan 40 IU PMSG i.m.....	37
2. Motilitas spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG pada suhu 4°C selama dua jam .....	37
3. Motilitas spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan Hijau yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG dan dicairkan dalam air pada suhu 37°C selama 30 detik.....	37
4. Abnormalitas morfologis spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG pada suhu 4°C.....	38
5. Abnormalitas morfologis spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan Hijau yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG dan dicairkan dalam air pada suhu 37°C selama 30 detik.....	38
6. Motilitas spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO pada suhu 4°C.....	38
7. Abnormalitas morfologis spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO pada suhu 4°C selama dua jam.....	39
8. Motilitas spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan Hijau yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO dan dicairkan pada suhu 37°C selama 30 detik.....	39
9. Abnormalitas morfologis spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan Hijau yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO dan dicairkan dalam air pada suhu 37°C selama 30 detik.....	39
10. Viabilitas spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan yang dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi EG atau DMSO dan disimpan pada suhu 37°C selama dua jam.....	39

## I. PENDAHULUAN

Di akhir penghujung abad kt-20, penduduk dunia yang semakin padat, memerlukan lahan yang semakin luas dan juga memerlukan lapangan pekerjaan. Kebutuhan manusia tersebut mulai mengeksploitasi sumber daya alam, termasuk lahan hutan beserta isi dari kehidupan biologisnya. Adanya deforestasi telah mengurangi habitat ayam Hutan Hijau. Selain itu ayam Hutan Hijau yang memiliki potensi ekonomi tinggi merupakan komoditi bisnis satwa langka yang sering diburu untuk diperjual belikan. Sampai saat ini ayarn Hutan Hijau sudah termasuk satwa langka yang terancam punah (terdaftar dalam lampiran CITES) dan perlu dilindungi keberadaan dan kelangsungan hidupnya.

Untuk mempertahankan keanekaan ekosistem dan kelestarian ayam Hutan Hijau perlu adanya usaha konservasi baik *secara in-situ* maupun *ex-situ*. Usaha-usaha pelestarian telah dilakukan, akan tetapi baru terbatas sampai peraturan konservasi yang ada untuk melindungi satwa tersebut. Demikian pula penelitian yang ada hubungannya dengan pelestarian, baru terbatas pada ilmu dasar seperti studi biologi, morfologi, endokrinologi, identifikasi dan penyebarannya di habitat asli. Usaha-usaha konservasi selain membutuhkan ilmu dasar juga hams sesegara mungkin secara paralel, simultan dan sinergis menggunakan teknologi konservasi yang didukung dengan iptek terapan. Salah satu iptek terapan di bidang reproduksi yaitu pembekuan semen (kriopreservasi), inseminasi dan induksi ovulasi, telah terbukti dapat dipakai dalam peningkatan produktivitas industri peternakan dan pelestarian plasma nutfah temak bernilai ekonomis. Teknologi reproduksi terapan tersebut dapat juga dimanfaatkan sebagai alat bantu atau metoda dalam usaha konservasi dan pelestarian satwa ayam Hutan Hijau yang terancam punah.

Ayam hutan jantan lebih kritis populasinya dibandingkan dengan betinanya, karena sering diburu. Selain dari segi morfologinya yang lebih menarik, ayam Hutan Hijau yang jantan dipakai sebagai pemacek ayam Lokal untuk mendapatkan keturunannya yang disebut ayarn Bekisar. Ditinjau dari segi kelestarian biologis, semen dapat dipakai sebagai pengganti pejantan atau berfungsi sebagai pejantan. Pejantan yang telah mati masih dapat memberikan keturunannya, jika rnasih tersedia semennya.

Melalui program kriopreservasi, semen dapat dibekukan dan disimpan dalam nitrogen cair bersuhu  $-196^{\circ}\text{C}$  untuk kurun waktu yang tidak terbatas (*long term storage*). Setiap saat semen beku dapat dicairkan kembali kesuhu tubuh dan dilakukan inseminasi buatan pada ayam betina untuk memperoleh keturunan. Teknologi kriopreservasi dapat melestarikan fungsi pejantan dari ayam Hutan Hijau, jika semennya berhasil dibekukan dan disimpan dalam nitrogen cair bersuhu  $-196^{\circ}\text{C}$

Dalam membekukan semen segar yang baru ditampung dari ayam, diperlukan krioprotektan yang dapat melindungi sel-sel spermatozoa dari cekaman proses perubahan fisika maupun kimiawi, ketika semen diturunkan suhunya sampai  $-196^{\circ}\text{C}$ . Krioprotektan baik jenis yang cocok maupun konsentrasi yang tepat atau optimal terbaik untuk ayam Hutan Hijau, sampai saat ini belum diketahui. Acuan yang dipakai banyak bersandar pada krioprotektan yang telah rutin dipakai untuk ruminansia dan hasil penelitian pembekuan semen ayam Lokal (Samuil 1999).

Penelitian ini dilaksanakan untuk mendapatkan metode pembekuan semen ayam Hutan Hijau dengan penekanan memilih jenis/macam krioprotektan yang cocok dan menentukan konsentrasinya yang tepat. Diharapkan semen beku ayam, yang telah dicairkan kembali memiliki kualitas yang tinggi dan laik inseminasi dengan motilitas, morfologis, viabilitas dan kemampuan fertilisasi yang tinggi. Pemeriksaan dan pengkajian mengenai morfologis spermatozoa beku dilakukan sampai tingkat ultrastruktur sel untuk mengetahui kerusakan spermatozoa secara rinci akibat proses kriopreservasi.

## II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 2.1 Tujuan Khusus

Aplikasi teknik pembekuan semen menggunakan metoda kriopreservasi, di Indonesia sudah mulai sejak dua setengah dekade yang lalu. Sampai saat ini pembekuan semen yang telah rutin dipakai yaitu pada semen sapi dan pemakaian terbatas pada daomba dan kambing. Pada pembekuan semen unggas baru tahap penelitian yaitu ayam Lokal dan burung puyuh, sedangkan khusus ayam hutan belum pernah dilakukan. Pembekuan semen ruminansia yang biasa menggunakan krioprotektan gliserol. Dari hasil penelitian pembekuan semen ayam menggunakan gliserol, walaupun hasil pencairannya menunjukkan kualitas semen yang baik tetapi kemampuan fertilisasi rendah. Untuk itu khusus pembekuan semen unggas diperlukan krioprotektan tertentu yang tidak sama dengan ruminansia.

Semen segar ayam Hutan Hijau memiliki kualitas yang berbeda dengan semen segar ayam Lokal, terutama pada karakter volume dan konsentrasinya. Volume dan konsentrasi semen ayam Hutan Hijau lebih rendah daripada ayam Lokal. Usaha peningkatan kualitas semen yaitu volume dan konsentrasi, telah terbukti pada penelitian tahun pertama HB VIII/1 dapat ditingkatkan dengan penyuntikan 40 IU PMSG i.m. Hasil pembekuan menggunakan krioprotektan dengan konsentrasi patokan sementara berdasar acuan krioprotektan yang dipakai dalam pembekuan semen ayam Lokal yaitu 6% (Samuil 1999), masih menunjukkan pertanyaan apakah kualitas semen beku ayam Hutan Hijau pascapencairan masih dapat ditingkatkan dengan menaikkan konsentrasi krioprotektan menjadi 8% atau bahkan h a m diturunkan menjadi 4%. Sehubungan dengan itu penelitian HB VIII/2 di tahun 200012001 ditargetkan untuk:

- a) Memilih dan menentukan salah satu jenis krioprotektan yang cocok, ethylene glycol (EG) atau dimethylsulfoxide (DMSO) untuk pembekuan semen ayam Hutan Hijau
- b) Menentukan dosis yang tepat dan optimal (4,6 atau 8%) dari krioprotektan EG dan DMSO dalam krioperservasi semen ayam Hutan Hijau, yang dapat menghasilkan kualitas semen beku pascapencairan yang tinggi
- c) Memeriksa kerusakan morfologis pada tingkat ultrastruktur, pada spermatozoa yang telah dibekukan melalui serangkaian tahap kriopreservasi.

## **2.2 Manfaat Penelitian**

- a) Menghindarkan ayam Hutan Hijau sebagai aves endemik Indonesia dari kepunahan
- b) Menciptakan satu paket teknologi untuk meningkatkan populasi ayam Hutan Hijau dan hibridnya (Bekisar) dengan menggunakan spermatozoa hasil kriopreservasi.
- c) Penciptaan peluang usaha baru di bidang pembenihan unggas khususnya ayam hutan
- d) Memperluas kesempatan khususnya bagi mahasiswa S1 dan pascasarjana untuk menggunakan aspek penelitian ini sebagai bahan penelitiannya
- e) Sebagai wahana bagi staf muda untuk meningkatkan keahliannya baik dalam pekerjaan di lapangan, laboratorium maupun penulisan laporan serta penerbitan publikasi artikel ilmiahnya
- f) Merintis pembentukan bank genetik khusus dalam bentuk semen beku unggas dalam rangka pelestarian satwa aves endemik yang terancam punah

### III. TINJAUAN PUSTAKA

Ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) jantan dari kepulauan Kangean (sebelah timur Pulau Madura) merupakan jenis unggas yang sering diburu untuk disilangkan dengan ayam Kampung biasa (*Gallus domesticus*) menghasilkan hibrida yang disebut ayam Bekisar (Delacour, 1977). Bekisar jantan mempunyai nilai yang sangat tinggi, bukan saja karena bulunya yang indah, tetapi lebih dari itu memiliki suara yang bunyinya panjang, bersih dan bernada tinggi. Sifat yang disebut belakangan inilah yang banyak dilombakan dan sering dipertaruhkan dalam kontes-kontes Bekisar. Meskipun kini pemeliharaan Bekisar jantan bukan monopoli kaum terkemuka, harganya masih tetap mahal dan popularitasnya pada kontes-kontes ayam Bekisar menjadikan ayam Hutan Hijau Kangean, sebagai bibit pejantan Bekisar, banyak dicari dan diburu orang.

Kini ayam Hutan Hijau sudah sulit ditemukan di hutan-hutan kepulauan Kangean, sehingga para peternak Bekisar di Kangean banyak menangkap pejantan di pulau Jawa (Among Satwa, 1990). Bila keadaan ini dibiarkan, ditambah dengan adanya ancaman yang disebabkan oleh deforestasi dan ulah manusia yang tidak bertanggung jawab terhadap lingkungannya, maka tidaklah mengherankan kalau suatu saat nanti ayam Hutan Hijau ini akan lenyap dari bumi Indonesia.

Untuk menanggulangi ancaman terhadap pemunahan, maka kelangsungan hidup ayam Hutan Hijau ini harus ditangani secara integral, karena ayam hutan hijau ini merupakan nenek moyang dari ayam-ayam domestik yang ada sekarang (Delacour 1977). Informasi mengenai karakteristik biologis-fisiologis ayam Hutan Hijau di Indonesia sangat sedikit dan penelitian terhadap spesies ini di habitat alamnya sangat langka. Penelitian terhadap ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) baru terbatas pada studi ekologis (Nishida 1980), tingkah laku (Arifinsyah 1987), morfologis (Nishida *et al.* 1985) dan ekofisiologis (Ichinoe *et al.* 1982). Widjajakusuma *et al.* (1992) telah melakukan penelitian tentang profil hormonal siklus reproduksi ayam Hutan Hijau dan dilaporkan bahwa kadar hormon steroid seks ayam Hutan Hijau, baik jantan maupun betina sangat fluktuatif. Menurut Leszczynski *et al.* (1985) adanya fluktuasi hormonal ini disebabkan adanya siklus bertelur, produktivitas dan adanya siklus musiman sepanjang tahun pada yang betina. Sedangkan pada jantan fluktuasi hormon steroid seks ini disebabkan adanya siklus seksual harian maupun musiman.

Pada daerah tropis, musim perkawinan ayam Hutan Hijau adalah antara Februari-Juni dan telur yang dihasilkan adalah 30-50 butir/tahun. Produksi ini akan meningkat tajam pada bulan April-Mei (Ichinoe *et al.* 1982, Widjajakusuma *et al.* 1993).

Inseminasi buatan (IB) pada unggas merupakan suatu alat dan teknik yang berharga dalam industri unggas maupun dalam industri unggas maupun riset penelitian. Dengan mengencerkan semen, maka pelaksanaan IB dapat lebih efisien tanpa mengurangi fertilitas (Bahr and Bakst dalam Hafez, 1987). Bahan pengencer semen yang selama ini digunakan untuk mengencerkan semen unggas adalah NaCl fisiologis 1,025% dengan pH 7,0-8,0, perbandingan 1:1 (Kosin 1969) dan dengan penambahan antibiotika 200-400 µg/ml. Bahan lain yang umum dipakai adalah Tris(hydroxymethyl)aminomethan yang ditambah kuning telur 12-20%, perbandingan 1:2 (Mermon 1981).

Pengawetan semen dilakukan dengan tujuan agar semen yang diperoleh masih dapat dipergunakan setelah beberapa waktu yang lama. Pengawetan ini sangat penting agar program IB dapat dilaksanakan seluasnya.

Pembekuan semen sebagai metode pengawetan semen harus memperhatikan keadaan spermatozoa, agar sel ini tetap hidup dan berfungsi. Menurut Foote (1969) masalah utama pada proses pembekuan semen adalah *cold shock* yang mengakibatkan penurunan persentase motilitas spermatozoa, penurunan aktivitas metabolik serta kerusakan-kerusakan lain. Gliserol merupakan krioprotektan intraselular yang melindungi spermatozoa dari pengaruh fisik dan kimiawi yang letal selama pembekuan (Salisbury 1985). Kadar optimum gliserol untuk pengencer sitrat kuning telur berkisar antara 7,0-7,6% volume dan dalam pengencer susu sekitar 10% (Almquist and Wickersham 1962 dalam Toelihere 1981).

Dosis inseminasi pada unggas berbeda-beda menurut spesies dan berdasarkan patokan mengandung 150 juta sel per dosis inseminasi. Dosis tersebut adalah 0,1 ml pada ayam, 0,025 ml pada kalkun, 0,3 ml pada itik dan 0,05 ml pada angsa (Toelihere 1981). Bakst dan Cecil (1992) melakukan percobaan IB pada kalkun dengan dosis 100 juta sperma dengan selang waktu inseminasi tiap satu minggu dan uji fertilitas dilakukan pada telur-telur setelah 7-10 hari inkubasi. Efisiensi penyimpanan sperma di dalam saluran reproduksi kalkun betina dan pelepasannya dari kantung-kantung

reproduksi tersebut dapat dicapai pada inseminasi yang dilakukan dua jam setelah oviposisi dengan dosis 200 juta sperma (Brillard 1993).

Studi tentang aplikasi IB dan tentang kriopreservasi semen dari burung non-domestik sangat bermanfaat dalam preservasi spesies yang terancam punah (Gee 1983). Kriopreservasi memungkinkan penyimpanan semen dalam waktu yang maksimal, namun prosesnya seringkali berakibat buruk terhadap kapasitas fertilisasi dari sperma. Ditemukannya sifat aktivitas protektif dari gliserol mempunyai pengaruh penting dalam pengembangan teknologi kriopreservasi semen. Efektivitas berbagai kriopreservasi telah dilaporkan misalnya dimethylsulfoxide (DMSO) mempunyai aktivitas protektif yang setara dengan gliserol. Sifat-sifat yang harus dipunyai krioprotektan adalah, a) kemampuan dalam mencegah bekunya air, b) solven bagi elektrolit, c) penetrasi bebas dari membran sel dan d) aktivitas non-toksik. Berbagai krioprotektan lain yang telah banyak dipakai untuk kriopreservasi semen unggas diantaranya dimethylformamid atau DMF (Tereschenko *et al.* 1992) sedangkan untuk kriopreservasi embrio satwa lainnya seperti kuda, babi, primata, hewan pengerat dan terutama ruminasia adalah ethylene glycol (EG). Knoprotektan tersebut merupakan yang sering dipakai pada berbagai spesies hewan.

Kriopreservasi semen merupakan proses dimana sampel dilarutkan dalam pengencer mengandung krioprotektan dan disimpan pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  dalam waktu lama. Keberhasilan teknik kriopreservasi untuk semen beku ini ditentukan oleh jenis krioprotektan. Knoprotektan harus dapat menjaga kemampuan fertilisasi semen. Proses sederhana pembeukan dan pencairan kembali sperma yang dilarutkan dalam garam fisiologis menyebabkan kematian sel (Stunden 1996).

Kematian sel ini berhubungan dengan terbentuknya kristal es intraseluler dan meningkatkan konsentrasi pelarut. Peningkatan konsentrasi pelarut ekstraseluler menyebabkan air tertarik keluar dari spermatozoa. Jika proses pembekuan terjadi secara lambat, air ini berperan ikut membentuk kristal es ekstraseluler (Saacke 1982). Bila proses pendinginan terlalu cepat, sel tidak bisa menahan kerusakan sel akibat hilangnya air (Mazur 1984).

Knoprotektan adalah senyawa yang ditambahkan pada sperma untuk mengurangi efek merusak yang diakibatkan oleh pembekuan atau pencairan kembali

(*thawing*). Berdasarkan kemampuannya masuk ke dalam sel, krioprotektan diklasifikasikan menjadi dua yaitu bersifat permeabel dan bersifat non-permeabel.

Krioprotektan permeabel seperti gliserol, EG, propilen glikol, propanediol, DMSO, DMF dan alkohol masuk ke dalam sel dan menurunkan temperatur pada titik dimana mulai terbentuk kristal es dari air (Mazur 1984). sebagai hasil terjadi penurunan jumlah kristal es yang terbentuk dan menurunkan konsentrasi pelarut sampai sel dalam keadaan sama dengan temperatur di bawah 0°C (Saacke 1982).

Krioprotektan non-permeabel seperti sukrosa, glukosa dan guta lain yang ditambahkan ke medium krioprotektan untuk mengatur proses perpindahan air melalui membran sel. Sukrosa yang bersifat impermeabel terhadap sel memiliki efek menstabilkan membran biologi dengan meminimalisasi perubahan drastis tekanan osmotik sehingga menurunkan jumlah krioprotektan yang masuk ke dalam sel dan mengurangi kemungkinan adanya efek toksik (Takeda *et al.* 1987).

Penelitian mengenai penggunaan semen ayam dalam teknik kriopreservasi sudah banyak dilakukan. Fertilitas yang baik didapatkan dengan semen yang sudah dibekukan dan disimpan dalam gliserol (Lake and Stewart 1978). Satu kelemahan dari gliserol adalah senyawa ini bersifat kontraseptif pada betina sehingga konsentrasi gliserol harus dikurangi sesudah pencairan kembali dan sebelum inseminasi (Lake and Ravie 1984). Menghilangkan atau mengurangi konsentrasi gliserol secara perlahan inilah yang sangat esensial untuk dapat mengurangi atau mengatasi efek kontraseptifnya (Hammerstedt and Graham 1992). Oleh karena itu dibutuhkan krioprotektan yang tidak menekan kemampuan fertilitasnya bila diinseminasikan dengan konsentrasi seperti yang dibutuhkan selama pembekuan. Ethylene glycol (EG) dan propilen glikol ditemukan sebagai krioprotektan alternatif tetapi belum terbukti lebih baik dari pada gliserol dalam kemampuannya menekan kerusakan akibat pembekuan (Lake and Ravie 1984).

## IV. MATERI DAN METODA PENELITIAN

### 4.1 Materi

#### 4.1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan, di dua lokasi yaitu a) Bagian Fisiologi dan Farmakologi, dan b) Bagian Reproduksi dan Kebidanan, serta di Fakultas Peternakan, IPB. Pemeliharaan ayam Hutan Hijau dan penampungan semen dilakukan di Bagian Fisiologi dan Farmakologi, sedangkan evaluasi dan pembekuan semen dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan, Bagian Reproduksi dan Kebidanan. Pemeriksaan morfologis ultrastruktur spermatozoa beku menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) dilakukan di Lembaga Biologi Nasional, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) dan di Fakultas Peternakan, IPB. Seluruh kegiatan operasional kerja laboratoris dimulai dari bulan April sampai November 2000.

#### 4.1.2 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang diperlukan untuk penelitian sebanyak 15 ekor ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) berkelamin jantan. Umur ayam sekitar 12-15 bulan. Hewan dikandangkan secara individual dan ditempatkan bersama dalam kandang yang besar. Pakan yang diberikan berupa pakan jadi (pakan komersial) berbentuk pellet. Minum dan pakan diberikan secara *ad libitum*.

Ayam Hutan Hijau diperlukan untuk memperoleh semen segar yang dipakai sebagai bahan penelitian. Sebelum dipakai dalam penelitian untuk ditampung dan diambil semennya, ayam harus sudah beradaptasi dengan lingkungannya baik terhadap kolektor semen maupun lingkungan kandang. Adaptasi memerlukan waktu satu bulan. Setelah terbiasa dengan lingkungan kandang dan kolektor, baru ayam tersebut dipakai dalam penelitian untuk ditampung semennya.

#### 4.1.3 Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang dipakai untuk penelitian diantaranya NaCl fisiologis, larutan *beltsville poultry semen extender* (BPSE), *deionized water* yang telah didestilasi, larutan eosin, alkohol, kertas tissue dan nitrogen cair. Hormon untuk induksi spermatoge-

nesis yaitu *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG<sup>a</sup>). Krioprotektan yang dipakai adalah ethylene glycol (EG<sup>b</sup>), dimethylsulfoxide (DMSO<sup>b</sup>).

Peralatan yang dipakai untuk penampungan semen dan evaluasi baik semen segar maupun semen beku adalah spoit 1cc, tabung koleksi semen berukuran 2 cc, mikroskop, gelas obyek, gelas penutup, rak tabung semen, pipet plastik, gunting atau *straw cutter*, *automatic thawer* dan lemari es. Sedangkan peralatan yang dilibatkan untuk kriopresevasi semen termasuk pembekuan dan pencairan semen beku yaitu meliputi tabung koleksi semen 2cc, tabung reaksi 5cc, dispenser (mikropipet), tip mikropipet, kotak styrofoam, seperangkat penyimpanan *semen beku* (*storage container*) atau kontainer<sup>d</sup> nitrogen cair (-196°C), pipet, jerami plastik (*cassou plastic straw*) berukuran 0,25 ml, spoit 1cc dilengkapi dengan konektor straw, rak tabung semen dalam kotak plastik, bunsen, termometer dan lemari es.

## 4.2 Desain dan Metoda Penelitian

### 4.2.1 Penyediaan Larutan Krioprotektan

Krioprotektan merupakan zat yang dapat melindungi sel atau mengurangi efek letal dalam proses pembekuan (kriopresevasi) dan dapat meningkatkan viabilitas sel beku pascapencairan. Zat pelindung pembekuan (krioprotektan) dilarutkan dalam pengencer semen sebagai medium dasar untuk pembuatan larutan krioprotektan. Dalam penelitian ini pengencer semen yang dipakai sebagai medium dasar adalah larutan BPSE (Tabel 1) menurut Bootwalla dan Miles (1992). Krioprotektan yang dipakai yaitu EG dan DMSO. Larutan krioprotektan dibuat dalam tiga taraf konsentrasi yaitu 4, 6 dan 8% (v/v).

### 4.2.2 Penampungan Semen Segar

Untuk memperoleh semen segar berkualitas baik dan dalam jumlah yang cukup untuk bahan penelitian, akan digunakan induksi spermatogenesis ayam Hutan Hijau dengan 40 IU PMSG. Seminggu sebelum ayam ditampung semennya untuk dapat dijadikan bahan penelitian, ayam disuntik dengan dosis 40 IU PMSG/0,2 cc per ekor dengan rute administrasi i.m. Setiap minggu dilakukan penampungan semen dengan cara pemijatan (*masase*).

---

a): Folligon<sup>®</sup>, Intervet, Belanda;

b): Merck, Jerman

d): Taylor Wharton, USA

Tabel 1. Komposisi formula larutan pengencer BPSE (Bootwalla and Miles 1992) yang dipakai sebagai medium dasar pembuatan larutan krioprotektan

Komponen	Satuan	Jumlah
Sodium glutamat (H <sub>2</sub> O)	g	0,867
Sodium asetat (3H <sub>2</sub> O)	g	0,43
Tripotasium sitrat (H <sub>2</sub> O)	g	0,064
Dipotassium hidrogenphosphate (3H <sub>2</sub> O)	g	1,27
Potassium monophosphate (anhydrous)	g	0,75
Magnesium chloride (6H <sub>2</sub> O)	g	0,034
Tris	g	0,195
Fructose	g	0,5
Aquabidest ad	ml	100
pH	-	7,5
Tekanan osmotik	mOsm/kg	333

Sebelum penampungan dimulai, bagian helakang ayam sekitar bibir dan bawah kloaka dibersihkan dengan kertas tissue yang telah dibasahi dengan NaCl fisiologis. Metode masase, menggunakan jemari tangan kanan mengusap punggung sampai pangkal ekor, diteruskan naik sampai keekomya. Perabaan yang tepat dan halus akan merangsang ayam hingga ekor terangkat, kaki agak merenggang, bagian kloaka membuka, biasanya jelas terlihat sepasang papila menonjol yang merupakan alat kelamin jantan (rudimenter) tempat bermuaranya duktus deferens. Secara cepat tangan kanan memfiksir dan menggenggam pangkal ekor.

Telunjuk dan ibu jari tetap menahan agar kedua papila tetap menonjol. Lakukan dengan tekanan tertentu hingga cairan putih seperti susu keluar. Cairan seperti susu tersebut adalah ejakulat, tampung menggunakan spoit 1 cc dengan cara menghisap dan koleksi ke dalam tabung sperma berukuran 2 cc, yang selanjutnya siap dipakai sebagai bahan penelitian.

#### 4.2.3 Pemeriksaan dan Evaluasi Semen Segar.

Evaluasi semen segar dilakukan untuk mengetahui kuantitas, kualitas dan karakteristiknya. Pemeriksaan semen dilakukan sesuai metoda baku yang meliputi evaluasi secara makroskopik dan mikroskopik. Pemeriksaan makroskopik meliputi volume, pH, warna dan konsistensi, sedangkan mikroskopik meliputi gerakan massa, motilitas, konsentrasi dan abnormalitas morfologi. Parameter kualitas semen segar yang diukur adalah karakteristik dari semen yaitu diantaranya volume, warna, konsistensi, pH, gerakan massa, motilitas, konsentrasi dan abnormalitas.

#### 4.2.4 Pembekuan (Kriopreservasi) Semen Ayam Hutan Hijau

Dalam penelitian ini digunakan dua macam krioprotektan yaitu EG dan DMSO dengan masing-masing tiga taraf konsentrasi yaitu 4, 6 dan 8% (v/v). Sebagai medium dasar untuk melarutkan krioprotektan dipakai medium BPSE.

Semen diencerkan langsung ke dalam masing-masing krioprotektan dengan konsentrasi 200 juta spermatozoa motil per ml. Pengenceran dilakukan satu tahap pada suhu ruangan. Semen yang telah diencerkan dengan krioprotektan segera dikemas. Semen dikemas ke dalam jerami plastik sistem Cassou dengan konsentrasi 50 juta spermatozoa/0,25ml. Pengisian atau pengemasan semen dalam jerami plastik (*plastic ministraw*) dilakukan secara manual menggunakan spoit 1 cc yang dilengkapi dengan konektor. Salah satu ujung ministraw yang terbuka ditutup dengan klem yang telah dipanaskan. Pengemasan tersebut tetap dilakukan di dalam kamar pada suhu sekitar 27°C. Semen yang telah dikemas dalam straw kemudian diekuilibrasikan. Ekuilibrasikan dalam krioprotektan dilakukan selama dua jam pada suhu 4°C & dalam lemari es (refrigerator).

Setelah waktu ekuilibrasikan dicapai, semen dalam kemasan straw dibekukan. Pembekuan dilakukan dalam styrofoam box berukuran 27,5x18,5x18,5 cm<sup>3</sup>. Semen yang telah diekuilibrasikan dan dikemas dalam jerami plastik, diletakkan horizontal pada rak ram kawat halus dan dibekukan dalam uap N<sub>2</sub> cair, yaitu 1 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 10 menit. Ketinggian nitrogen cair dalam kotak styrofoam sekitar 12,5 cm. Semen yang telah beku kemudian dicelupkan kedalam nitrogen cair (-196°C) dan disimpan selama seminggu untuk kemudian dievaluasi.

#### 4.2.5 Evaluasi Semen Beku Ayam Hutan Hijau

Semen beku yang telah disimpan seminggu, dicairkan menurut metoda Senger (1980), yaitu semen beku dimasukkan ke dalam air pada suhu 37°C selama 30 detik. Untuk mencairkan straw bersemen beku digunakan alat *automatic fhawer*. Parameter yang diukur dalam pemeriksaan semen adalah persentase motilitas dan abnormalitas morfologi. Kemudian sebagian semen beku yang telah cair diukur daya tahan hidupnya di luar tubuh (*viabilitas in vitro*) pada suhu 37°C selama dua jam. Parameter yang diukur untuk *viabilitas in vitro* adalah persentase motilitas. Kerusakan spermatozoa akibat cekaman fisik-kimiawi dalam proses kriopreservasi diperiksa menggunakan metoda SEM menurut Bakst and Sexton (1979).

#### 4.2.6 Prosedur Kerja Metoda Pemeriksaan dan Evaluasi Semen

**Konsentrasi.** Konsentrasi spermatozoa dihitung secara kuantitatif menggunakan kamar hitung hemacytometer Neubauer. Semen segar ayam Hutan Hijau yang akan dihitung konsentrasinya diencerkan sebanyak 200 kali dengan larutan eosin 2%, menggunakan pipet pengencer yang dihubungkan dengan selang karet (*mouth piece*). Konsentrasi yang diperoleh adalah jumlah spermatozoa dalam lima kotak besar hemacytometer dikalikan dengan faktor  $10^7$  per ml semen.

**Persentase motilitas.** Persentase motilitas adalah persentase spermatozoa hidup yang bergerak kesegala arah baik bergerak di tempat, berputar sirkuler, mundur atau maju progresif (Sorensen 1979). Diatas gelas obyek, drop satu tetes (20 $\mu$ l) semen segar dan campur dengan NaCl fisiologis satu tetes, kemudian tutup dengan *cover glass*. Jika yang diperiksa semen beku, satu tetes semen beku yang telah cair ditutup dengan *cover glass*. Evaluasi menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Motilitas spermatozoa diukur secara kualitatif. Hitung dengan justifikasi proporsi sperma yang bergerak dan yang tidak bergerak dalam satu lapang pandang. Ulangi dalam 10 lapang pandang yang berbeda dan tentukan persentase sperma yang motil.

**Persentase abnormalitas.** Persentase abnormalitas adalah persentase spermatozoa yang mengalami perubahan morfologis. Evaluasi dilakukan dengan pewarnaan 2% eosin. Preparat ulas yang dibuat diperiksa menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Hitung sperma yang normal dan abnormal dalam

satu lapang pandang sekitar 10 spermatozoa. Ulangi dalam 10 lapang pandang yang berbeda. Evaluasi dilakukan terhadap 100 spermatozoa dan tentukan persentase abnormalitasnya.

**Pemeriksaan Abnormalitas Spermatozoa Menggunakan SEM.** Pemeriksaan spermatozoa menggunakan SEM dimaksudkan untuk mengetahui kerusakan sel pada tingkat subseluler (ultrastruktur), yang diakibatkan oleh proses fisiko kimia pembekuan untuk mencapai suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Persiapan spesimen semen beku untuk pemeriksaan SEM, dilaksanakan melalui prosedur kerja sbb.:

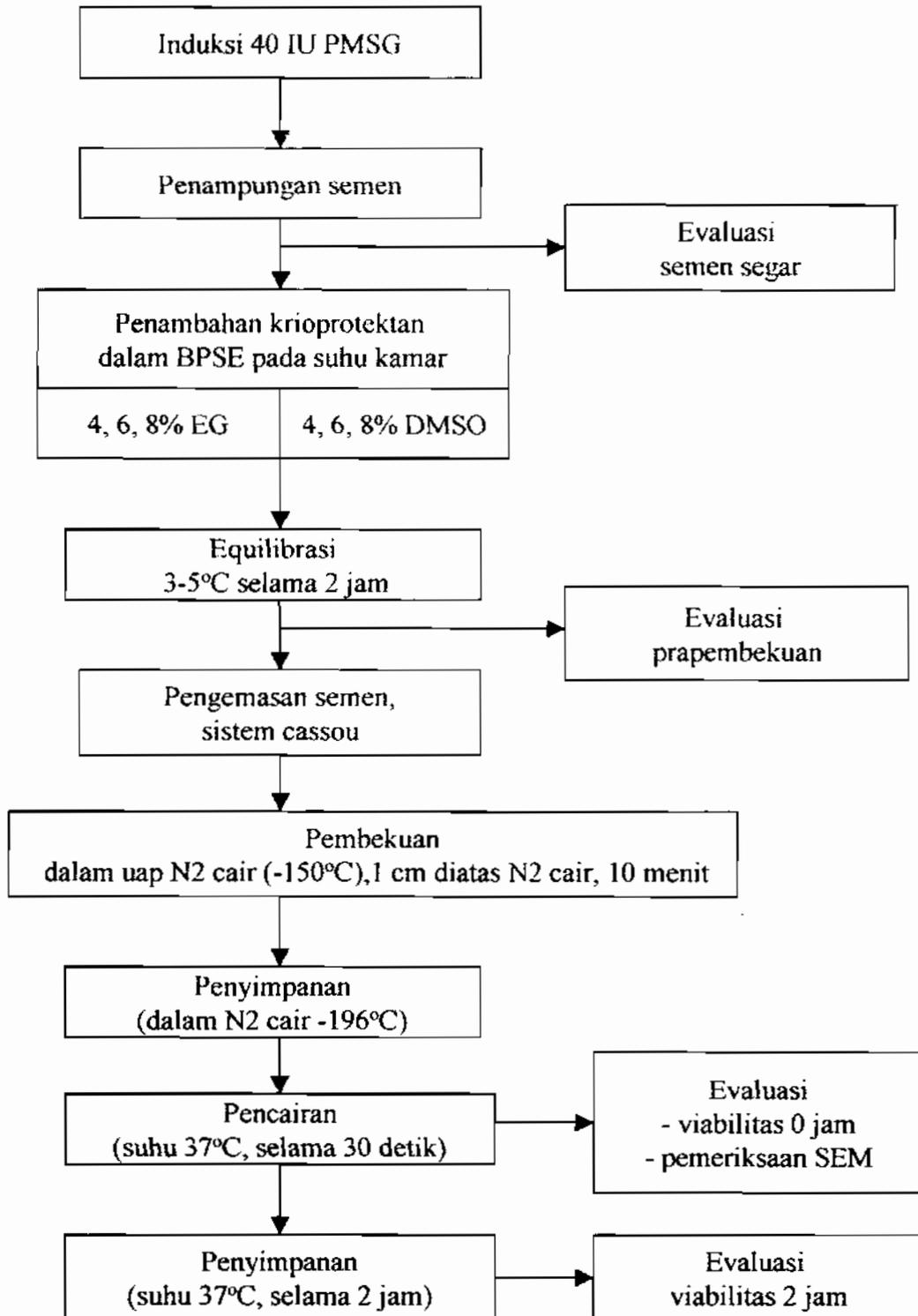
- a) **Pencucian spesimen dengan larutan NaCl fisiologis.** Sampel semen beku yang telah dicairkan dicuci dengan larutan NaCl fisiologis. Campur hingga homogen secara baik (*gentle agitation*). Sel-sel spermatozoa dalam larutan NaCl fisiologis disimpan selama beberapa jam pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .
- b) **Pencucian spesimen dengan ethanol.** Sentrifugasi campuran sampel dengan larutan NaCl fisiologis dengan kecepatan 2.500 rpm selama lima menit. Buang supernatan (larutan NaCl fisiologis). Endapan sel-sel spermatozoa tambah dengan ethanol 50%. Resuspensi dalam ethanol 50%. Cuci sel-sel spermatozoa dalam ethanol 50% selama 10 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ , dua kali atau lebih.
- c) **Dehidrasi spesimen.** Buang setengah bagian supernatan ethanol 50%. Tambah dengan ethanol absolut. Campur (*gentle agitation*) hingga homogen. Sel-sel spermatozoa didehidrasi secara bertahap dalam seri ethanol dengan konsentrasi meningkat pada suhu kamar (gunakan sentrifuge jika perlu).
  - e. 1 Ethanol 75% : 10 menit
  - e. 2 Ethanol 80% : 10 menit
  - e. 3 Ethanol 94% : 10 menit
  - e. 4 Ethanol absolut: 10 menit, lakukan dua kali atau lebih
- d) Sentrifugasi dan buang supernatan ethanol absolut. Resuspensi endapan sel-sel spermatozoa dalam ethanol absolut. Tambah sedikit ethanol absolut. Buat suspensi sel-sel spermatozoa dalam ethanol absolut.
- e) Drop suspensi sel-sel spermatozoa diatas *cover slip* yang telah didinginkan (*chilled cover slip*). *Freeze dry* sel-sel spermatozoa pada *cover slip*.
- f) **Periksa menggunakan SEM.** Lekatkan *cover slip* dengan spermatozoa kering pada *stub*. Periksa dengan SEM setelah *metal coating*. Untuk melihat

kerusakan ultrastruktur, seperti membran plasma, akrosom, postakrosom, bagian leher dan ekor spermatozoa diperiksa dengan SEM (x5.000 atau x10.000).

#### **4.2.7 Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian pembekuan semen adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 2x3 dengan dua faktor yaitu jenis krioprotektan (EG dan DMSO) dan faktor konsentrasi (4,6 dan 8%), sehingga didapatkan enam kombinasi perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali ulangan dan setiap ulangan dilakukan pemeriksaan tiga kali (triplo). Data dianalisa menggunakan sidik ragam (Anova) searah dan dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel and Torrie 1993). Selain itu untuk mengetahui dosis yang tidak teruji disidik dengan analisa perbandingan arah yang dikenal dengan metoda polinomial. Pengolahan data menggunakan komputer dengan program Minitab versi 11. Sedangkan kerusakan sel-sel spermatozoa pada tingkat subseluler (ultrastruktur) yang terjadi akibat proses fisiko kimia dalam kriopreservasi yang terdeteksi melalui pemeriksaan SEM, dianalisa secara deskriptif.

Secara menyeluruh prosedur kerja penelitian dan tahapan evaluasi dapat diringkas dalam skema alur kegiatan penelitian yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 : Alur kegiatan prosedur kerja proses pembekuan semen ayam Hutan Hijau yang dikemas dalam jerami plastik cassou

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara umum definisi kriopreservasi adalah metoda biologis penyimpanan *germplasm* dalam suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  dengan tujuan mempertahankan viabilitas sel melalui reduksi atau interupsi fungsi-fungsi metaboliknya. Penurunan aktifitas metabolik, akan menghentikan kegiatan biokimiawi dan dapat menurunkan risiko perubahan fisiologis dan karakter genetik (Whiters 1985). Melalui proses kriopreservasi sel yang telah disimpan dalam suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  dalam jangka waktu tidak terbatas tetap viabel dan tidak mengalami kerusakan sel (termasuk organelnya). Faktor-faktor yang dapat menimbulkan kerusakan sel selama proses kriopreservasi berlangsung diantaranya adalah suhu (*cold shock*), mekanis (jumlah dan bentuk kristal es ekstra- dan intra seluler), kemikal (medium pengencer atau krioprotektan) dan cekaman osmotik (tekanan osmotik medium)(Parks and Graham 1992). Faktor-faktor cekaman tersebut dapat menimbulkan efek negatif bahkan letal terhadap spermatozoa, sehingga sel yang akan dibekukan harus memenuhi kriteria tertentu agar kelangsungan viabilitasnya dapat terjamin.

### 5.1 Semen Ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) yang Dipakai dalam Penelitian dan Persyaratan Kelaikan Beku

Kelaikan semen untuk dapat dibekukan atau dikriopreservasi, harus memenuhi persyaratan yang menunjukkan bahwa semen berkualitas baik dan laik beku. Persyaratan kelaikan dibuat untuk memberikan keberhasilan semen yang akan dibekukan. Serangkaian proses pembekuan memiliki pengaruh destruktif terhadap spermatozoa yang dampaknya terlihat adanya kerusakan morfologis, penurunan motilitas dan tentunya akan menurunkan fertilitas sperma. Kerusakan yang mengakibatkan penurunan fertilitas banyak terjadi pada saat proses cair beku dan pencairan kembali dari keadaan beku. Menurut Keel *et al.* (1987), pada semen manusia motilitas spermatozoa menurun sampai mencapai lebih dari pada 50% akibat pembekuan dengan persentase pemulihan sebesar 43% yang menunjukkan penurunan motilitas sebesar 60% dari motilitas awal.

Berdasarkan hasil beberapa penelitian pembekuan semen ruminansia dan ayam Lokal (Samuil 1999), proses kriopreservasi semen, dapat menimbulkan kerusakan berupa penurunan kualitas semen yang berkisar 40-50% dari kualitas awal.

Persyaratan yang telah ditentukan terlebih dahulu, dengan kriteria motilitas (hidup) minimal 80%, maka tingkat pemulihan pascapencairan kembali diasumsikan 40% masih laik digunakan untuk inseminasi buatan. Pada penelitian ini semen segar diperoleh dari 15 ekor ayam Hutan Hijau jantan (*Gallus varius*) dengan kisaran umur sekitar 12-15 bulan. Semen segar yang dipergunakan dalam pembekuan memiliki konsentrasi  $3,036 \pm 0,225$  milyar spermato-zoa/ml semen, motilitas  $87,86 \pm 1,01\%$ , dan abnormalitas  $10,471 \pm 0,479\%$  (Tabel 2.). Semen segar tersebut telah memenuhi persyaratan minimal dan dinilai laik pembekuan.

Tabel 2. Karakteristik kualitas semen segar ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) yang dipa-kai dalam penelitian

Karakteristik semen	Satuan	Nilai rata-rata
Warna	-	putih susu
Konsistensi	-	kental
Volume	ml	$0,014 \pm 0,001$
pH	-	$7,270 \pm 0,018$
Gerakan massa	-	+
Motilitas	%	$87,86 \pm 1,01$
Konsentrasi	$10^9$ sel/ml	$3,036 \pm 0,225$
Abnormalitas	%	$10,471 \pm 0,479$

## 5.2 Proses Pendinginan, Ekuilibrisasi dan Pembekuan

Semen yang akan dikriopreservasi selain harus memenuhi persyaratan kelaikan pembekuan juga harus mengalami serangkaian proses biofisik-kimiawi hingga dapat dibekukan. Proses kriopreservasi tersebut diantaranya proses adaptasi suhu dan konsentrasi (osmolaritas). Sebelum semen dibekukan dan disimpan pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ , semen dicampur dengan pengencer berkrioprotektan pada suhu kamar dan diturunkan suhunya atau didinginkan secara bertahap sampai  $4-5^{\circ}\text{C}$  dalam refrigerator. Proses pendinginan dan ekuilibrisasi bertahap ini ditujukan untuk menghindari cekaman dingin (*cold shock*), yang juga dapat menimbulkan kerusakan morfologis (*chilling injury*), cekaman perubahan osmolaritas larutan pengencer atau krioprotektan dan penurunan metabolisme sel dengan harapan toksisitas krioprotektan menurun.

Semen ruminansia yang diturunkan suhunya secara mendadak dapat mengalami *cold shock*. White (1993) dalam penelitiannya melaporkan bahwa *cold shock* dapat diatasi melalui pendinginan secara lambat selama proses preservasi dan dapat lebih diturunkan dengan penambahan kuning telur pada semen. Lebih lanjut dinyatakan bahwa pendinginan secara lambat diharapkan dapat mengurangi tingginya konsentrasi kalsium di dalam larutan krioprotektan, karena suhu lingkungan akan meningkatkan penarikan kalsium oleh spermatozoa. Efek *cold shock* akan menguat dan memperburuk keadaan spermatozoa jika tingkat laju pendinginan dipercepat. Selain itu kuning telur yang ada dalam larutan pengencer/krioprotektan mengandung lecithin dan lipoprotein yang dapat mensubstitusi komponen membran plasma yang rusak sehingga efek *cold shock* dapat dicegah.

Spermatozoa unggas lebih resisten terhadap *cold shock* (*chilling injury*) daripada spermatozoa babi dan ruminansia. Glycolipid membran plasma spermatozoa unggas berbeda nyata pada sifat molekuler dan fase thermotropiknya dari pada glycolipid spermatozoa mamalia. Secara kontras kandungan protein plasma membran spermatozoa unggas adalah rendah, persentase ethanolamine phosphoglyceride dalam total lipid spermatozoa juga rendah, dan kekurangan komponen bertitik cair tinggi dalam glycolipid-nya (Parks and Lynch 1992). Profil molekul membran plasma spermatozoa ayam jelas lebih tahan terhadap perubahan fisik yang terjadi pada suhu yang rendah.

Dalam seluruh proses kriopreservasi, sel spermatozoa akan mengalami berbagai macam perubahan dan cekaman fisiologis, diantaranya saat pengenceran, penambahan krioprotektan dan ekuilibrisasi prapembekuan, penyusutan sel karena dehidrasi dalam merespon larutan hipertonik akibat induksi pembentukan kristal es ekstraseluler, pembentukan kristal es intra- dan ekstraseluler. Semua prosedur yang dialami spermatozoa selama kriopreservasi sangat mempengaruhi viabilitas dan aktivitas metabolisme yang dapat tertekan secara permanen (Parks and Graham 1992). Spermatozoa yang mengalami tekanan viabilitas dan aktivitas metabolisme, secara morfologis dapat terlihat dengan adanya kerusakan sel berupa spermatozoa yang menjadi abnormal (kerusakan membran plasma, tudung akrosom dan kerusakan ekor spermatozoa) selain itu motilitas spermatozoa juga menurun.

### **5.3 Motilitas dan Morfologis Spermatozoa Ayam Hutan Hijau Pada Tahap Pascaekuilibrasi dan Pencairan Kembali**

Dalam proses kriopreservasi, sel yang akan dibekukan diproses melalui beberapa tahapan pembekuan. Tahapan tersebut yaitu mulai dari tahap pengenceran, ekuilibrasi (penyesuaian temperatur, osmolaritas dan kimiawi larutan dalam satuan periode waktu tertentu), proses pembekuan sampai tahap pascapencairan kembali termasuk viabilitas sel dalam satuan waktu tertentu. Tahap yang sangat kritis adalah tahap proses pembekuan yaitu dari tahap ekuilibrasi, pembekuan sampai pencairan kembali.

Krioprotektan adalah zat kimia nonelektrolit yang berfungsi mereduksi pengaruh detrimental atau letal kriopreservasi sel, baik efek larutan maupun efek mekanis dari pembentukan kristal es ekstra- dan intraseluler sehingga dapat menjaga viabilitas sel setelah pencairan kembali ke keadaan fisiologis. Kemampuan proteksi dari krioprotektan EG, dan DMSO agar spermatozoa tetap morfologis intak dan viabel disetiap tahap proses kriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4. Motilitas spermatozoa prapembekuan, yang telah diekuilibrasi (pascaekuilibrasi) dalam EG dan DMSO pada konsentrasi 4, 6 dan 8%, selama dua jam pada suhu 4°C tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) yaitu masing-masing untuk 4% EG (72,22%), 6% EG (70,00%) dan 8% EG (68,89%). Begitu pula motilitas spermatozoa yang diekuilibrasi dengan 4, 6, 8% DMSO berturut-turut sebesar 71,67; 71,66 dan 67,78%.

Tabel 3. Rataan motilitas komparatif spermatozoa dari ayam Hutan Hijau yang dibekukan dengan krioprotektan ethylene glycol (EG) dan dimethylsulfoxide (DMSO) dalam konsentrasi 4, 6 dan 8% pada tahapan proses pembekuan

Tahap pembekuan	Motilitas spermatozoa (%)					
	4% EG	6% EG	8% EG	4% DMSO	6% DMSO	8% DMSO
Pascaekuilibrasi (prapembekuan)	72,22a	70,00a	68,89a	71,67a	71,66a	67,78a
Pascapencairan (pencairan kembali)	53,89b	56,11b	52,78b	53,33b	55,00b	36,11c
Penurunan dari ekuilibrasi ke pencairan kembali	18,33d	13,89d	16,11d	18,34d	16,66d	31,67e

b,c : dalam baris yang sama, berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ )

d,e : dalam baris yang sama, berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ )

Keberhasilan pembekuan dapat dilihat dari motilitas pascapencairan. Motilitas pascapencairan spermatozoa yang dikriopreservasi dalam 4, 6 dan 8% EG yaitu masing masing 53,89; 56,11 dan 52,78% tidak berbeda nyata dengan yang dibekukan dalam 4 dan 6% DMSO yaitu 53,33 dan 55,00%; akan tetapi berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) dengan spermatozoa yang dibekukan dalam 8% DMSO yaitu hanya 36,11%. Berdasarkan persyaratan minimal kelaikan semen beku untuk inseminasi pada sapi (Petunjuk Teknis Pelaksanaan IB, BIB Lembang 1999), domba dan kambing (Evans and Maxwell 1987) yang mensyaratkan bahwa motilitas pasca pencairan kembali untuk inseminasi semen beku tidak boleh kurang dari 40%, maka semen ayam Hutan Hijau yang dibekukan baik dalam 4, 6 dan 8% EG maupun 4 dan 6% DMSO memiliki motilitas spermatozoa pasca pencairan diatas persyaratan motilitas minimal yang berlaku bagi semen beku ruminansia. Sedangkan yang dibekukan dalam 8% DMSO, menghasilkan motilitas pascapencairan dibawah persyaratan minimal yang berlaku bagi ruminansia.

Penurunan motilitas dari prapembekuan ke pascapencairan, untuk spermatozoa yang dibekukan dalam 4% EG (18,33%), 6% EG (13,89%) dan 8 % EG (16,11%) masing-masing tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dengan semen yang dibekukan dalam 4% DMSO (18,34%) atau 6% DMSO (16,66%). Penurunan motilitas yang terendah terdapat pada spermatozoa yang dibekukan dalam 6% EG yaitu sebesar 13,89%

sedangkan penurunan motilitas tertinggi terjadi dalam 8% DMSO yaitu sebesar 31,67%. Ethylene glycol (EG) memiliki daya proteksi yang sama pada setiap tingkat konsentrasi 4, 6 atau 8%. Kemampuan DMSO pada peringkat konsentrasi 8% jelas menurun ( $P<0,01$ ) dalam memproteksi sel yang dikriopreservasi jika dibandingkan dengan 4 atau 6%.

Pada Tabel 4. terlihat abnormalitas spermatozoa prapembekuan yang telah diekuilibrasikan dalam EG atau DMSO pada peringkat konsentrasi baik 4, 6 maupun 8%, tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) dan proporsinya masih kurang dari 15%. Menurut Busch *et al.* (1982) persyaratan parameter abnormalitas spermatozoa dari semen ayam untuk dapat dipakai dalam inseminasi, jika abnormalitasnya tidak lebih dari 15%. Setelah pembekuan yaitu pada pascapencairan abnormalitas spermatozoa meningkat melebihi angka 15% dan yang paling tinggi tingkat kerusakannya yaitu semen yang dibekukan dalam 8% DMSO. Peringkat kerusakan spermatozoa yang dibekukan baik dalam 4, 6 dan 8% EG masing-masing 18,56; 18,52 dan 19,33% tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) dengan tingkat kerusakan spermatozoa yang dibekukan dalam 4 dan 6% DMSO yaitu sebesar 19,80 dan 20,61% akan tetapi nyata lebih rendah abnormalitasnya ( $P<0,01$ ) dari pada sperma yang dibekukan dalam 8% DMSO yaitu sebesar 28,12%.

Tabel 4. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa dalam berbagai konsentrasi ethylene glycol (EG) dan dimethylsulfoxide (DMSO) pada tahapan proses pembekuan

Tahap pembekuan	Abnormalitas spermatozoa (%)					
	4% EG	6% EG	8% EG	4% DMSO	6% DMSO	8% DMSO
Pascaekuilibrasikan (prapembekuan)	10,20a	11,34a	11,22a	10,33a	11,13a	12,47a
Pascapencairan (pencairan kembali)	18,56b	18,52b	19,33b	19,80b	20,61b	28,12c
Peningkatan kerusakan dari ekuilibrasikan ke pencairan kembali	8,36d	7,18d	8,11d	9,47d	9,48d	15,65e

b,c : dalam baris yang sama, berbeda sangat nyata ( $P<0,01$ )

d,e : dalam baris yang sama, berbeda sangat nyata ( $P<0,01$ )

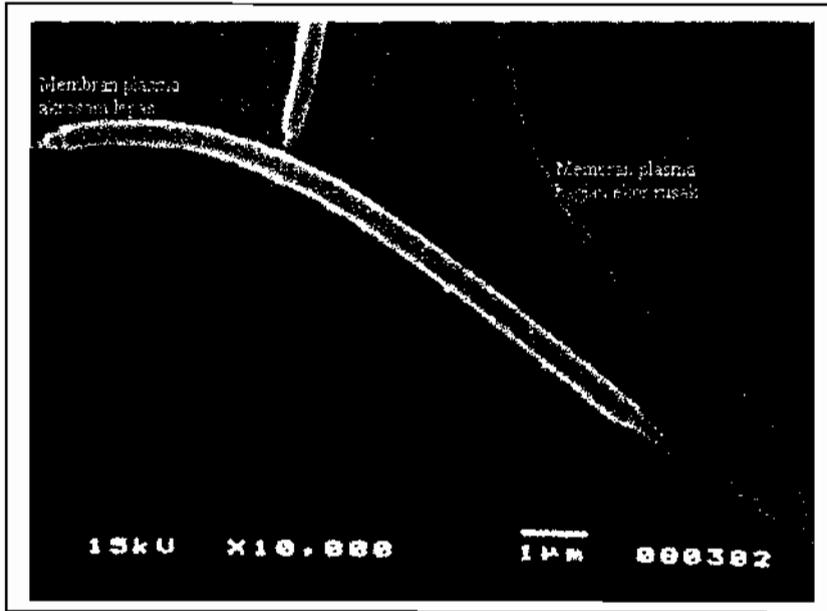
Kejadian abnormalitas spermatozoa yang dibekukan dalam krioprotektan baik EG, maupun DMSO pada kisaran konsentrasi 4 sampai 8%, terjadi lebih banyak di

daerah ekor daripada kepala. Ragam kerusakan dapat berupa ekor putus, tanpa ekor, ekor bengkok (*coiled tailed*), kepala sperma bengkak atau mengkerut. Kerusakan morfologis yang tampak pada sperma yang dibekukan dalam DMSO pada umumnya kepala sperma membengkak dan kerusakan berupa ekor putus atau tanpa ekor (Gambar 2). Sedangkan yang dibekukan dalam EG terlihat kepala sperma bengkak dan ekor putus atau tanpa ekor (Gambar 3).

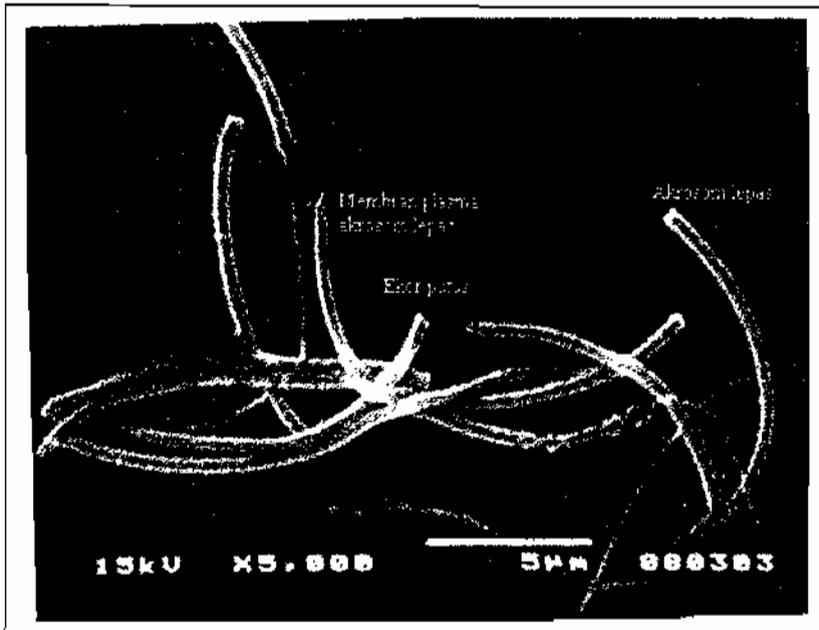
Pada pemeriksaan morfologis pascapencairan menggunakan SEM, sperma yang dibekukan dengan DMSO menunjukkan kerusakan di bagian leher, kepala sperma membengkak, ekor putus dari bagian tengah ekor (*midpiece*), membran akrosom rusak/sobek dan lepas (Gambar 4) , atau bahkan seluruh bagian akrosom lepas dari bagian ujung anterior kepala sperma (Gambar 5). Demikian pula halnya pada sperma yang dibekukan dengan EG, ditemukan kerusakan di bagian leher, ekor sperma putus, membran akrosom sobek atau bahkan seluruh bagian akrosom terlepas, dan kepala sperma membengkak. Jumlah sperma yang mengalami kerusakan akrosom pada sperma yang dibekukan dalam EG relatif lebih sedikit dibanding pada sperma yang dibekukan dalam DMSO. Akan tetapi pembengkakan kepala sperma yang terjadi pada sperma yang dibekukan dalam EG tampak lebih besar dibandingkan dengan sperma yang dibekukan dalam DMSO (Gambar 6).

#### **5.4 Viabilitas Spermatozoa Beku Pascapencairan**

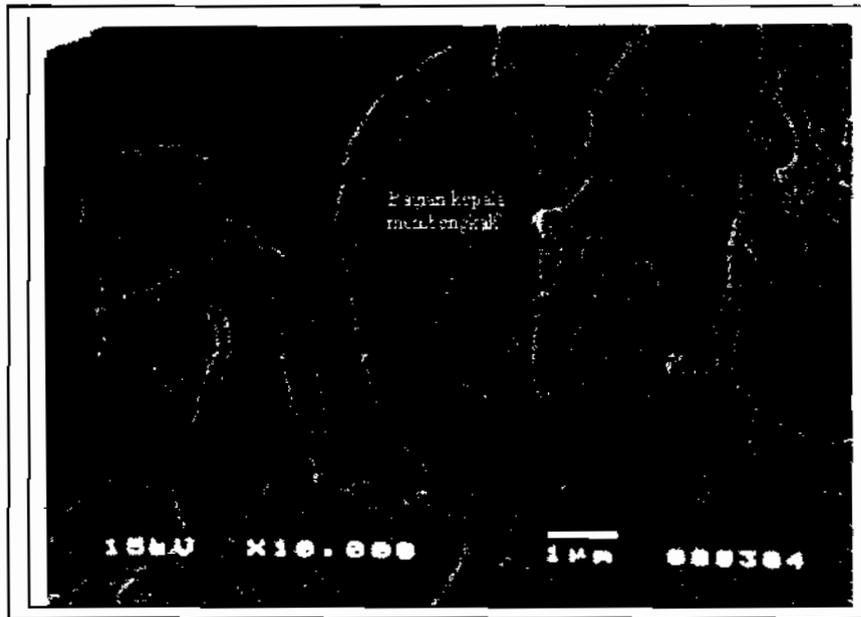
Sperma yang diinseminasi kedalam uterus, sebelum membuahi (fertilisasi) sel telur, harus menjalani perjalanan yang cukup panjang dari tempat deposisi semen waktu diejakulasikan sampai dengan tempat fertilisasi dan harus mengalami serangkaian proses kapasitasi. Selama perjalanannya dalam uterus dan mengalami proses kapasitasi, sperma harus menyesuaikan dengan lingkungan fisiko-kimiawi uterus diantaranya suhu, enzim dan hormonal, dalam satuan waktu tertentu. Salah satu faktor



Gambar 4. Sperma *Gallus varius* yang dibekukan dalam DMSO, mengalami kerusakan pada membran plasma pembungkus akrosom atau membran plasma akrosom telah terlepas (SEM pembesaran 10.000 x).



Gambar 5. Scanning electron micrograph sperma ayam Hutan Hijau yang dibekukan dalam DMSO (Pembesaran 5.000 x).



Gambar 6. Mikrofotografi SEM pada pemeriksaan sperma beku ayam Hutan Hijau yang dibekukan dengan EG (Pembesaran 10.000 x).

yang harus diadaptasi adalah suhu uterus itu sendiri. Keadaan suhu lingkungan *in vivo* tersebut, dapat disimulasi secara *in vitro* pada suhu 37°C untuk mengetahui daya tahan hidup (viabilitas) sperma. Tabel 5. menyajikan data mengenai viabilitas sperma *in vitro* selama dua jam pada suhu 37°C. Viabilitas sperma yang telah dibekukan dalam 8% DMSO tidak dapat bertahan sampai dua jam dengan rata-rata motilitas yang hanya 2,22% dan merupakan motilitas terendah dibanding dengan semua perlakuan lainnya ( $P < 0,01$ ). Sperma yang dibekukan dalam 4, 6 atau 8% EG dan 4 atau 6% DMSO, masih viabel selama dua jam dengan motilitas berkisar antara 6,67 sampai dengan 8,33%.

Secara umum pada suhu 37°C, dalam sel terjadi reaksi metabolisme yang cukup tinggi. Krioprotektan baik EG maupun DMSO yang masih berada dalam sel akan dimetabolisir. Krioprotektan yang toksik akan mempercepat kematian sel. Peringkat toksisitas krioprotektan tergantung dari jenis dan dosisnya. Menurut Kasai (1996), DMSO lebih toksik daripada EG. Secara biologis EG tidak toksik terhadap sel. Hasil uji viabilitas spermatozoa beku pada suhu 37°C selama dua jam, menunjukkan bahwa EG pada tiga taraf dosis pembekuan (4, 6 atau 8%) menunjukkan viabilitas yang sama. Tidak demikian halnya dengan DMSO, viabilitas terendah

viabilitas yang sama. Tidak demikian halnya dengan DMSO, viabilitas terendah terjadi pada sperma yang dibekukan dalam 8% DMSO. Viabilitas terendah tersebut terjadi karena 8% DMSO merupakan krioprotektan yang paling toksik diantara perlakuan lainnya atau efek toksiknya jelas terlihat di banding dengan konsentrasi 4 atau 6% DMSO.

Tabel 5. Daya tahan hidup (viabilitas) spermatozoa beku pascapencairan pada suhu 37°C

Lama penyimpanan (jam)	Motilitas spermatozoa (%)					
	4% EG	6% EG	8% EG	4% DMSO	6% DMSO	8% DMSO
0	53,89a	56,11a	52,78a	53,33a	55,00a	36,11b
2	8,33c	7,22c	6,67c	7,78c	6,67c	2,22d
Penurunan motilitas dalam 2 jam	45,56	48,89	46,11	45,55	48,33	33,89

a,b : dalam baris yang sama, berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ )

c,d : dalam baris yang sama, berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ )

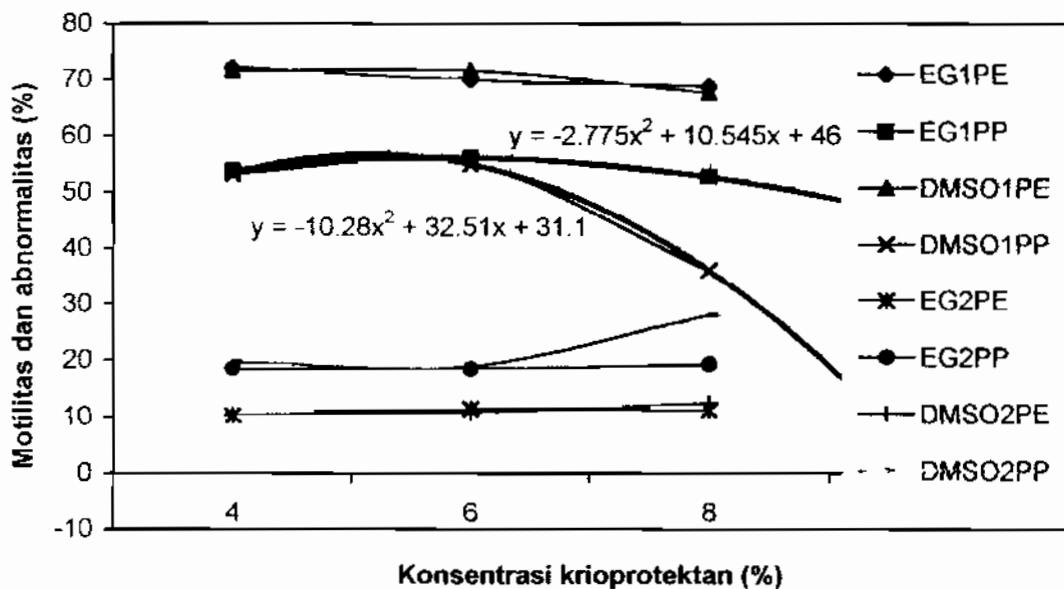
Data viabilitas pascapencairan yang ditampilkan tersebut adalah viabilitas spermatozoa *in vitro* yang hanya dipengaruhi oleh faktor suhu saja. Faktor-faktor internal lingkungan *in vivo* lainnya seperti enzim, hormonal dan nutrisi yang secara alamiah menunjang dalam proses perjalanan spermatozoa dalam oviduct tidak diuji cobakan. Viabilitas spermatozoa beku pascapencairan ayam yang diperoleh dari penelitian tentunya rendah jika dibandingkan dengan keberadaan sperma segar setelah diejakulasikan secara alamiah dalam lingkungan *in vivo* yang sebenarnya. Pada sapi, keberadaan sperma dalam uterus (*fertile life* dan *gamet longevity*) post ejakulasi berkisar 30-48 jam (Hafez, 1987), bahkan pada unggas jauh lebih lama dari mamalia. Pada unggas setelah kopulasi atau inseminasi, spermatozoa dapat berada dalam *oviduct sperm storage tubules* (SST) pada ayam selama 32 hari dan pada kalkun dapat mencapai 70 hari. Proses spermatozoa masuk, survive dan keluar dari SST belum diketahui secara jelas (Bahr dan Bakst 1993).

### 5.5 Penentuan Dosis Optimal Krioprotektan EG dan DMSO

Motilitas semen ayam Hutan Hijau yang telah diencerkan dengan krioprotektan pada suhu kamar dan diekuilibrasikan pada suhu 4°C selama dua jam, memiliki selang nilai, yang secara empiris terendah terjadi pada spermatozoa dalam 8% DMSO (67,78

$\pm 1,21\%$ ) dan tertinggi dalam 4% EG ( $72,22 \pm 1,21\%$ ). Proporsi spermatozoa motil diatas 40% dapat dinilai laik untuk inseminasi. Demikian pula abnormalitas pascaekuilibrasi, berkisar diantara  $10,20 \pm 0,40\%$  yang terjadi dalam semen 4% EG sampai dengan  $12,47 \pm 0,54\%$  yang terdapat dalam 8% DMSO. Jumlah abnormalitas tersebut masih di bawah 15% dan dianggap laik untuk inesminasi buatan untuk semen cair (Busch *et al.* 1982). Krioprotektan EG dan DMSO dengan konsentrasi 4 sampai dengan 8% yang telah dipakai untuk mengencerkan semen segar ayam Hutan Hijau dan diekuilibrasi pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ , (belum dibekukan pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ ) tidak menyebabkan kerusakan fatal yang menyebabkan semen menjadi tidak laik untuk inseminasi.

Semen yang telah dibekukan  $-196^{\circ}\text{C}$  dan dicairkan kembali, mengalami penurunan motilitas sekitar 13,89 sampai dengan 31,67% disertai dengan peningkatan kerusakan spermatozoa akibat pembekuan (abnormalitas) dengan kisaran 7,18 sampai dengan 15,65%. Penurunan motilitas dan peningkatan abnormalitas karena proses pembekuan dan pencairan kembali terjadi paling drastis dan tertinggi terjadi dalam semen yang dibekukan dalam 8% DMSO dan berbeda sangat nyata ( $P<0,01$ ), baik diantara perlakuan semua konsentrasi (4,6 atau 8%) maupun krioprotektan EG atau DMSO. Penurunan motilitas dan peningkatan kerusakan spermatozoa akibat proses pembekuan-pencairan kembali terlihat jelas dalam tampilan grafik garis yang tersaji dalam Gambar 7.



Keterangan:

- EG1PE : motilitas spermatozoa dalam EG pascaekuilibrase
- EG1PP : motilitas spermatozoa dalam EG pascapencairan
- DMSO1PE : motilitas spermatozoa dalam DMSO pascaekuilibrase
- DMSO1PP : motilitas spermatozoa dalam DMSO pascapencairan
- EG2PE : abnormalitas spermatozoa dalam EG pascaekuilibrase
- EG2PP : abnormalitas spermatozoa dalam EG pascapencairan
- DMSO2PE : abnormalitas spermatozoa dalam DMSO pascaekuilibrase
- DMSO2PP : abnormalitas spermatozoa dalam DMSO pascapencairan

Gambar 7. Profil komparatif motilitas dan abnormalitas spermatozoa ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) dalam berbagai konsentrasi krioprotektan EG dan DMSO pada tahap pascaekuilibrase dan pascapencairan kembali.

Dalam penentuan dosis krioprotektan yang diteliti dan diuji, seperti terlihat dalam Gambar 7, taraf perlakuan yang diujikan dalam penelitian terbatas pada tiga taraf yaitu 4, 6 dan 8% krioprotektan. Untuk memperoleh pendekatan yang lebih tepat dan mencakup seluruh konsentrasi yang tidak diujikan (seperti konsentrasi 5 dan 7%) digunakan analisis perbandingan arah untuk mengetahui hubungan fungsi antara respon dan perlakuan dosis yang diujikan. Berdasarkan perbandingan arah menggunakan metoda polinomial diperoleh persamaan fungsi untuk penentuan konsentrasi krioprotektan EG adalah:  $Y = -2,775X^2 + 10,545X + 46$ , sedangkan untuk konsentrasi DMSO mempunyai persamaan fungsi  $Y = -10,28X^2 + 32,51X + 31,1$ . Peubah tidak bebas Y adalah motilitas spermatozoa pasca pencairan dan X adalah peubah bebas untuk konsentrasi krioprotektan EG atau DMSO.

Semen beku dapat dipakai untuk inseminasi buatan jika memenuhi persyaratan tertentu. Pada semen beku unggas (ayam) sampai saat ini belum ada kriteria yang dapat dipakai sebagai persyaratan kelayakan, apakah semen ayam yang telah dibekukan dapat dipakai atau tidak untuk inseminasi. Yang telah ada kriteria persyaratan kelayakan semen beku yaitu untuk semen beku ruminansia (sapi, kerbau, domba dan kambing). Menurut petunjuk teknis dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang (1999), dalam *quality control* untuk uji kualitas hasil produksi semen beku sapi, berdasarkan kriteria motilitas pascapencairan yaitu minimal 40% dengan viabilitas *in vitro* 4 jam minimal 10%. Demikian pula halnya untuk domba dan kambing (Evans and Maxwell 1987) yang mensyaratkan bahwa motilitas pasca pencairan kembali untuk inseminasi semen beku tidak boleh kurang dari 40%. Jika kriteria dari BIB Lembang dan hasil temuan Evans dan Maxwell (1987), dapat berlaku umum untuk semua ternak termasuk ayam, maka semen ayam hutan yang dibekukan dalam EG dengan konsentrasi 4, 6 atau 8% sedangkan DMSO berkonsentrasi 4 atau 6% dapat dipakai untuk inseminasi buatan.

#### **5.6 Efektivitas Krioprotektan Ethylene Glycol (EG) dan Dimethylsulfoxide (DMSO) Dalam Proses Kriopreservasi**

Ethylene glycol (EG) sebagai krioprotektan intraseluler yang berperan dalam mekanisme pembekuan merupakan alkohol dihidrat dengan dua gugus hidroksil, memiliki kemampuan pengikatan air yang kuat (*water binding*), dapat mencegah peningkatan konsentrasi yang ekstrim dan dapat menghindari terjadinya pembentukan kristal es pada titik beku larutan sehingga melindungi spermatozoa terhadap pembentukan kristal es intraseluler. Sel spermatozoa akan mengalami dehidrasi terkendali sampai terjadinya pembekuan intraseluler pada kisaran suhu  $-35$  sampai dengan  $-45^{\circ}\text{C}$ , sehingga pembentukan kristal es dalam jumlah yang besar tidak terjadi. Selain itu EG mempunyai efek pengikatan membran plasma yang secara langsung mengikat fosfolipid pada kelom-pok kepala yang menurunkan fluiditas membran dan berinteraksi dengan protein dan glikoprotein membran yang menyebabkan penumpukan partikel intra membran.

Penggunaan krioprotektan yang telah universal dipakai diseluruh dunia terutama untuk pembekuan semen mamalia (ruminansia, kuda, babi dan primata) adalah gliserol dengan konsentrasi berkisar 4-8%. Secara fisiko-kimia gliserol

memiliki banyak kesamaan sifat dengan EG, yaitu diantaranya kedua-duanya termasuk golongan alkohol dan memiliki daya ikat yang kuat dengan air. Ethylene glycol (EG) memiliki bobot molekul 62,07 lebih rendah dari pada gliserol dengan bobot molekul 92,10. Bobot molekul yang rendah dengan kedua gugus hidroksilnya, EG memiliki kemampuan fisik berdifusi secara cepat kedalam sel atau keluar dari sel secara cepat pula. Karakter fisik tersebut, EG dapat mengatasi gangguan ataupun perbedaan osmotik intra- dan ekstraseluler yang terjadi dalam proses kriopreservasi.

Secara biologis EG memiliki keunggulan dari gliserol diantaranya sifat toksiknya lebih rendah dari gliserol (Kasai 1996). Penggunaan gliserol dengan konsentrasi 7% untuk pembekuan semen ayam pernah dilakukan dalam penelitian oleh Schramm (1986) dan dari hasil penelitiannya disimpulkan bahwa, walaupun motilitas pascapencairan kembali tinggi akan tetapi angka fertilitasnya rendah dan diduga gliserol bersifat kontraseptif. Menurut Fahy (1986) penggunaan krioprotektan dalam pengencer untuk pembekuan harus memperhatikan sifat toksisitasnya yang berkaitan dengan komposisi pengencer, metoda pencampuran, ekuilibrasi, pendinginan dan pembekuan. Untuk gliserol dengan metoda pembekuan lambat diperlukan konsentrasi optimal antara 6-8% (Fiser and Fairfull 1989). Pada pembekuan cepat konsentrasi 3-4% memberikan hasil yang terbaik (Salamon and Ritar 1982). Selain itu, Tuli and Holtz (1994) menyampaikan beberapa hasil temuan dari penelitiannya, yaitu pengenceran semen dengan larutan pengencer berkrioprotektan gliserol (gliserolisasi) yang dilakukan pada suhu 37°C secara bertahap memberikan hasil yang terbaik. Menurutnya ekuilibrasi suhu atau pendinginan semen pada suhu 5°C yang dilakukan sebelum gliserolisasi, pada metoda dua tahap dalam kriopreservasi semen, memberikan hasil yang merugikan. Begitu pula pencucian plasma semen sebelum pembekuan dalam pengencer berkuning telur akan mengakibatkan penurunan motilitas dan menimbulkan peningkatan kerusakan sel setelah pembekuan.

Hasil temuan para peneliti sebelumnya yang menggunakan gliserol sebagai krioprotektan pada pembekuan semen mamalia (ruminansia), sejalan dengan hasil yang ditemukan pada penelitian penggunaan EG dalam kriopreservasi semen ayam Hutan Hijau ini. Ethylene glycol (EG) pada tingkat konsentrasi 4, 6 atau 8% mampu melindungi sel terhadap cekaman fisik dan kimiawi dalam proses kriopreservasi. Metoda pembekuan yang digunakan untuk pembekuan semen ayam Hutan Hijau

adalah satu tahap, pencampuran EG pada suhu kamar dengan ekulibrasi pendinginan pada 4°C selama 2 jam.

Melalui data penelitian yang terjaring, dapat ditunjukkan bahwa DMSO dengan konsentrasi 8% memberikan hasil pembekuan yang terendah (motilitas terendah dan abnormalitas sperma tertinggi). Jika data ini dikaji banding dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Singh *et al.* (1995), data temuan tersebut sejalan maknanya. Singh *et al.* (1995), melaporkan bahwa semen kambing yang dibekukan dengan gliserol menunjukkan kerusakan akrosom sangat rendah pada saat pencairan kembali. Sedangkan kerusakan akrosom yang tinggi terjadi pada semen yang dibekukan dengan DMSO berkonsentrasi tinggi. Dimethylsufoxide (DMSO) dapat memberikan hasil yang cukup baik dengan motilitas tinggi jika dibekukan dengan konsentrasi 4% (Busch *et al.* 1982).

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan data yang terkompilasi dan teranalisa dalam evaluasi hasil penelitian menunjukkan bahwa, kedua jenis krioprotektan baik EG maupun DMSO dapat dipakai untuk pembekuan semen ayam Hutan Hijau. Konsentrasi EG yang dapat dipakai untuk pembekuan 4, 6 atau 8%, sedangkan DMSO sebaiknya 4 atau 6%. Ethylene glycol (EG) pada taraf konsentrasi 4,6 dan 8% dapat berfungsi sebagai krioprotektan dalam pembekuan dan tidak bersifat toksik terhadap sel spermatozoa. Demikian pula DMSO pada taraf 4 dan 6% dapat dipakai sebagai krioprotektan akan tetapi pada taraf 8%, DMSO menunjukkan efek toksiknya terhadap viabilitas spermatozoa pada suhu 37°C.

Pada pemeriksaan morfologis pascapencairan menggunakan SEM, sperma yang dibekukan baik dengan DMSO maupun EG, secara umum menunjukkan kerusakan di bagian leher, kepala sperma membengkak, ekor putus dari bagian tengah ekor (*midpiece*), membran akrosom rusak/sobek dan lepas atau bahkan seluruh bagian akrosom lepas dari bagian ujung anterior kepala sperma.

### 6.2 Saran

Penelitian yang sedang dilakukan telah dapat menentukan jenis dan peringkat taraf dosis krioprotektan yang dapat dipakai dalam pembekuan semen ayam Hutan Hijau. Temuan tersebut berdasar penelitian yang telah dilaksanakan dalam taraf laboratorium. Hasil penelitian belum aplikatif jika belum terbukti keberhasilannya di tingkat lapang. Untuk itu perlu uji fertilitas semen beku melalui metoda inseminasi buatan.

Untuk mengetahui tingkat kerusakan yang ditimbulkan pada proses kriopreservasi terhadap spermatozoa ayam Hutan Hijau perlu pemeriksaan morfologi yang lebih terperinci sampai tingkat ultrastruktur.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah. 1996. Pengaruh beberapa pengencer semen, lama penyimpanan semen dan waktu inseminasi terhadap fertilitas spermatozoa ayam buras. Thesis. Program Pasca-sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Among Satwa. 1990. Buletin-KPBSI Among Satwa Among Arik Lestari No. 33 Th. IV. 16.
- Arifinsyah. 1987. Studi perilaku ayam Hutan (*Gallus varius*) dan kemungkinan pengelolaannya di Taman Nasional Baluran, Jawa Timur. Skripsi Sarjana FKH IPB, Bogor.
- Bahr, J.M. and M.R. Bakst. 1993. Poultry. In: Hafez, E.S.E. (ed.). Reproduction in Farm Animals. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia. Lea & Febiger.
- Bakst, M.R. and H. Cecil. 1992. Effect of modification of semen diluent with cell culture serum replacement on fresh and stored turkey semen quality and hen fertility. Poultry Sci. 71:754-764.
- Bakst, M.R. and T.J. Sexton. 1979. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. J.Reprod. Fert. 55:1-7.
- Bootwalla, S.M. and R.D. Miles. 1992. Development of diluents for domestic fowl semen. Poultry Sci. 48:121-128.
- Brillard, J.P. 1993. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. Poultry Sci. 72:923-928.
- Busch, W., K. Loehle and W. Peter. 1982. Kuenstliche Besamung bei Nutztieren. Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart.
- Delacour, J. 1977. The Pheasants of the World. 2<sup>nd</sup> ed. Spur. Publ. and the World Pheasant Assoc. Survey. 189 pp.
- Foot, R.H. 1969. Physiological Aspect of Artificial Insemination. In: Cole, H.H. and P.T. Cupps. (eds.), Reproduction of Domestic Animals. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York and London. 313-314.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 1987. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Hafez, E.S.E. (ed.). Reproduction in Farm Animals. 5<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger Philadelphia. 189-209.
- Gee, G. 1983. Crane Reproductive Physiology and Conservation. Zoo Biology 2:199-213.
- Hafez, E.S.E. 1987. Transport and survival of gametes. In: Hafez, E.S.E. (ed.), Reproduction in Farm Animals. 5<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hammerstedt, R.H. and J.K. Graham. 1992. Cryopreservation of poultry semen; the enigma glycerol. Cryobiology 29:26-38.
- Hammerstedt, R.H. 1995. Cryopreservation of poultry semen – current status and economics. In: Bakst, M.R. and G.J. Wishart. (eds.), Proceedings First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy.H. 229-250.
- Herman, H.A. 1968. Frozen Semen. In: Perry, E.J. (ed.) The Artificial Insemination of Farm Animals. New Brunswick, New Jersey, Rutgers University Press.343-373.

- Ichinoe, K., S. Watanabe, I. Munechika, M. Nishiwaki and T. Watanabe. 1982. *Physio-logical and Ecological Studies on Jungle Fowls*. Cooperative Research Report, Ministry of Education Science and Culture of Japan.
- Knobil, E., J. Neil, L.E. Ewing, C.L. Markert, G.S. Greenwald and D.W. Pfaff. 1988. *The Physiology of Reproduction*. Vol.1. Raven Press, Ltd. New York.
- Kosin, S.I.L. 1969. *Reproduction of Poultry*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Lake, P.E. 1971. The male in reproduction. In: Bell, D.J. and B.M. Freeman. (eds.). *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. 3<sup>rd</sup> ed. New York. Academic Press.
- Lake, P.E. and J.M. Stewart. 1978. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen. An improved method. *Poultry Sci.* 19:187-194.
- Lake, P.E. and O. Ravie. 1984. An exploitation of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Brit. Poult. Sci.* 25:145-150.
- Leszczynski, D.F., R.C. Hagan, J.J. Bitgord and F.A. Kummerow. 1985. Relationship of plasma estradiol and progesteron levels to egg productivity in domestic chicken hens. *Poultry Sci.* 64:545.
- McDonald, L.E. and M.H. Pineda. 1989. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger. Philadelphia. London.
- Maeda, T., T. Terada and Y. Sutsumi. 1984. Comparative study of the effects of freezing of various cryoprotectants in preserving the morphology frozen and thawed fowl spermatozoa. *Brit. Poult. Sci.* 25:547-553.
- Mazur, P. 1984. Freezing of Living Cells: Mechanisme and Implications. *Am.J. Physiol.* 247:125-142.
- Mermon, M.A. and R.S.Ott. 1981. Method of Semen Preservation and Artificial Insemination in Sheep and Goats. *World Rev. of Anim. Prod.* XVIII:19-23
- Nishida, T. 1980. *Japan Sci., Press, Tokyo*. 303 pp.
- Nishida, T., Y. Hayashi, T. Hashiguchi and S.S. Mansyoer. 1985. Morphological identification and distribution of jungle fowl in Indonesia. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 56:598-610.
- Pineda, M.H. 1989. Male reproduction. In: McDonald, L.E. and M.H. Pineda. (eds.), *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger. Philadelphia. London. 261-301.
- Saacke, R.G. 1982. What happens when a sperm is frozen and thawed?. *Proceeding of the 9<sup>th</sup> Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. Held April 30-Mei in Milwaukee, Wisconsin. National Association of Animal Breeders and NAAB. 6-12.
- Salisbury, G.W. and N.L. Vandemark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Terjemahan R. Djanuar. Jogjakarta. Gadjahmada University Press.
- Samuil, M. 1999. *Kajian komparatif aplikasi krioprotektan EG, DMSO dan DMF dalam medium BPSE terhadap kualitas semen beku ayam Lokal*. Skripsi Sarjana. FKH IPB. Bogor.
- Sanbrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniasis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA.
- Sastrodihardjo, S., S. Iskandar, T. Nurmala dan Paggi. 1994. Daya tahan hidup spermatozoa ayam Buras dalam berbagai pengencer semen dengan penyimpanan pada suhu kamar. *Prosiding Pertemuan Nasional Pengolahan dan Komunikasi Hasil-Hasil Penelitian*. Semarang. 137-144.

- Smyth, J.R. 1968. Poultry. In: Perry, E.J. (ed.). The Artificial Insemination of Farm Animals. 4<sup>th</sup> ed. Rutgers University Press. New Jersey. 258-299.
- Sorensen, A.M.Jr. 1979. Repro Lab. A Laboratory Manual for Animal Reproduction. 4<sup>th</sup> Ed. American Press. Boston. Massachusetts.
- Steel, R.G.D. and J.H.Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistik. Terjemahan Bambang Sumantri. Gramedia. Jakarta.
- Stunden, C.E. 1996. Studies on Reproductive Characteristics and Artificial Insemination in Captive Mallard Ducks (*Anas platyrhynchos*). The University of British Columbia.
- Sturkie, P.D. 1976. Avian Physiology. 3<sup>rd</sup> ed. Springer-Verlag. New York. 303-345.
- Takeda, T. Elsdon and Seidel G.E. 1987. Use of sucrose during removal of cryoprotectants after thawing eight-cell mouse embryos. Theriogenology 28:101-108.
- Tereschenko, M.R., A.B. Artemenko and N.I. Sakhatsky. 1992. Cryopreservation of chicken semen. Proceeding of 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. The Hague. 1602-1604.
- Toelihere, M.R. 1981 Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Utami, I.A.P. 1995. Pengaruh berbagai macam pengencer semen dan dosis inseminasi buatan terhadap fertilitas dan daya tetas telur pada ayam Buras. Thesis. Program Pascasarjana, IPB. Bogor.
- Widjajakusuma, R., S.H.S. Sikar, D. Rita Ekastuti and H. Maheshwari. 1993a. A study of reproductive hormonal profile in the Green Jungle Fowl (*Gallus varius*) in an attempt to conserve the endemic avian species in Indonesia. Presented at the discussion with Prince Akishino on the Present Status of Indonesian Jungle and domestic Fowl. Bogor, Indonesia, Aug.6,1993.
- Widjajakusuma, R., S.H.S. Sikar, D. Rita Ekastuti and H. Maheshwari. 1993b. A study of reproductive hormonal profile in the Green Jungle Fowl (*Gallus varius*) in an attempt to conserve the endemic avian species in Indonesia. Presented at the second Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society Comparative Endocrinology, 26-29 October 1993, Chiangmai, Thailand.
- Widjajakusuma, R., S.H.S. Sikar, D. Rita Ekastuti and H. Maheshwari. 1992. Studi Profil Hormonal Siklus Reproduksi Ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) dalam Usaha Menunjang Pelestarian dan Penangkaran Aves Asli Indonesia. Lap. Penel. IPB. Bogor.
- Williams-Ashman, H.G. 1988. Perspectives in the Male Sexual Physiology of Eutherian Mammals. In: Knobil, E., J. Neil, L.E. Ewing, C.L. Markert, G.S. Greenwald and D.W. Pfaff. (eds.). The Physiology of Reproduction. Vol.1. Raven Press, Ltd. New York.
- Wishart, G.J. 1985. Quantitation of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. Brit. Poult. Sci. 26:375-380.

## **LAMPIRAN**

Tabel lampiran 1. Spesifikasi rata-rata kualitas semen ayam Hutan Hijau hasil penampungan dari kelompok perlakuan yang mendapat penyuntikan 40 IU PMSG i.m.

Penga- matan ke-	Makroskopis				Mikroskopis			
	Vol. (ml)	Warna	Konsis- tensi	pH	Gerak- an massa	Konsen- trasi (10 <sup>9</sup> sel /ml)	Motil- itas (%)	Abnor- malitas (%)
1.	0,010	kuning- bening	kental	7,27	+	2,66	85,0	12,1
2.	0,013	putih	kental	7,22	+	2,73	85,0	11,3
3.	0,017	putih	kental	7,35	+	2,94	90,0	10,2
4.	0,019	krem	kental	7,26	+	2,80	90,0	9,8
5.	0,014	krem	kental	7,28	+	3,38	90,0	8,6
6.	0,012	krem	kental	7,30	+	4,23	85,0	11,7
7.	0,016	krem	kental	7,21	+	2,51	90,0	9,6
Rataan	0,014	krem	kental	7,27	+	3,036	87,86	10,47
SEM	0,001	krem	kental	0,02	+	0,225	1,01	0,48

Tabel lampiran 2. Motilitas spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG pada suhu 4°C selama dua jam

Konsentrasi EG (%)	Motilitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	65;70;70	75;70;75	75;75;75
6	70;75;65	70;65;70	75;70;70
8	75;65;65	70;65;70	75;65;70

Tabel lampiran 3. Motilitas spermatozoa pascapencairan semen beku Ayam Hutan yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG dan dicairkan dalam air pada suhu 37°C selama 30 detik

Konsentrasi EG (%)	Motilitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	55;55;60	50;50;55	55;50;55
6	60;65;60	45;50;50	60;55;60
8	55;60;55	50;50;45	50;55;55

Tabel lampiran 4. Abnormalitas morfologis spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasikan dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG pada suhu 4°C selama dua jam

Konsentrasi EG (%)	Abnormalitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	11,7;8,9;10,6	10,5;12,3;9,6	8,7;9,6;9,9
6	9,8;10,8;14,6	9,7;11,8;13,1	9,8;10,4;12,1
8	9,6;13,7;12,3	10,5;9,8;10,7	12,4;11,3;10,7

Tabel lampiran 5. Abnormalitas morfologis spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan Hijau yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan EG dan dicairkan dalam air pada suhu 37°C selama 30 detik

Konsentrasi EG (%)	Abnormalitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	17,5;17,4;16,9	16,5;18,4;19,9	18,6;19,3;22,6
6	19,7;19,9;24,7	18,1;17,6;16,7	16,7;18,2;15,1
8	22,7;21,1;20,5	19,3;18,4;19,2	19,3;17,2;16,3

Tabel lampiran 6. Motilitas spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasikan dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO pada suhu 4°C selama dua jam

Konsentrasi DMSO (%)	Motilitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	75;70;70	70;75;65	75;75;70
6	70;70;70	75;70;75	75;70;70
8	65;70;70	75;65;65	70;65;65

**Abnormalitas spermatozoa (dengan pewarnaan eosin 2%)**

EG	DMSO
- ekor putus >>	- tanpa ekor >>>>
- tanpa ekor >	- ekor putus >>
- ekor bengkok >	- ekor bengkok >
- kepala sperma bengkak	- <i>coiled tailed</i>
	- kepala menyusut/mengkerut

Kejadian abnormalitas spermatozoa yang dibekukan dalam berbagai krioprotektan baik EG, DMSO maupun DMF terjadi lebih banyak di daerah ekor daripada kepala.

Tabel lampiran 7. Abnormalitas spermatozoa prapembekuan semen ayam Hutan Hijau yang telah diekuilibrasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO pada suhu 4°C selama dua jam

Konsentrasi DMSO (%)	Abnormalitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	10,6;9,8;8,7	12,9;11,2;8,5	10,3;11,4;9,6
6	11,6;9,7;13,5	8,9;10,7;13,6	9,7;11,3;11,2
8	12,4;13,9;11,7	14,5;12,7;13,1	10,5;9,6;13,9

Tabel lampiran 8. Motilitas spermatozoa pascapencairan semen beku Ayam Hutan yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO dan dicairkan pada suhu 37°C selama 30 detik

Konsentrasi DMSO (%)	Motilitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	45;60;55	55;55;50	55;55;50
6	50;60;50	55;55;60	60;50;55
8	35;30;45	40;35;45	35;30;30

Tabel lampiran 9. Abnormalitas morfologis spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan Hijau yang telah dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi krioprotektan DMSO dan dicairkan dalam air pada suhu 37°C selama 30 detik

Konsentrasi DMSO	Abnormalitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4	17,3;19,7;23,1	18,5;17,1;20,3	19,7;23,6;18,9
6	19,8;25,1;18,9	19,1;18,6;17,2	19,3;22,8;24,7
8	28,7;25,5;27,9	27,8;25,7;29,1	27,9;30,6;29,9

Tabel lampiran 10. Viabilitas spermatozoa pascapencairan semen beku ayam Hutan Hijau yang dikriopreservasi dalam pelbagai konsentrasi EG atau DMSO dan disimpan pada suhu 37°C selama dua jam

Konsentrasi Krioprotektan	Viabilitas Spermatozoa (%)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
4% EG	10;10;5	10;5;5	10;15;5
6% EG	10;5;5	10;5;10	10;5;5
8% EG	5;5;10	10;5;10	5;5;5
4% DMSO	10;10;5	5,5,10	10,5,10
6% DMSO	5,10,10	5,5,5	10,5,5
8% DMSO	5,5,0	5,5,0	0,0,10