

## **Pengaruh Konsentrasi Dimetil Sulfoksida pada Pembekuan Lambat dan Cepat terhadap Kualitas Sperma Ayam Bangkok Post Thawing**

### ***Effect of Dimethyl Sulfoxide Concentration in Slow and Fast Freezing on Post-Thaw Sperm Quality of Bangkok Chicken***

**Khaeruddin<sup>1\*</sup>, Hermawansyah<sup>1</sup>, Junaedi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai, Sulawesi Selatan, Indonesia

<sup>2</sup> Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Peternakan, dan Perikanan, Universitas Sembilan Belas November Kolaka, Sulawesi Tenggara, Indonesia

\*Email: [erukhaeruddin@gmail.com](mailto:erukhaeruddin@gmail.com)

Naskah diterima: 8 Februari 2026, direvisi: 17 Maret 2026, disetujui: 20 April 2026

#### **Abstract**

This study aimed to evaluate the effects of slow and fast freezing methods with different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the post-thaw sperm quality of Bangkok chickens. A completely randomized design with five treatments and five replications was applied. The treatments consisted of slow freezing with 7% and 14% DMSO, and fast freezing with 7%, 14%, and 21% DMSO. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test when significant differences were detected. Fresh semen collected from roosters was initially evaluated both macroscopically and microscopically. In the fast freezing method, semen was directly subjected to prefreezing and freezing without an equilibration step. In contrast, slow freezing involved an equilibration phase prior to prefreezing and freezing. Post-thaw evaluations included sperm motility, viability, and abnormality. The results showed that neither fast nor slow freezing significantly affected sperm motility (19–25%) or abnormality (39.74–49.40%). However, freezing methods significantly influenced sperm viability, with rapid freezing using 14% DMSO yielding the highest viability (68.98%). In conclusion, fast freezing has the potential to replace the conventional slow freezing method commonly used in the cryopreservation of Bangkok chicken semen.

**Keywords:** chicken sperm; cryopreservation; DMSO; fast freezing; slow freezing

#### **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pembekuan cepat dan lambat dengan berbagai konsentrasi dimetil sulfoksida (DMSO) terhadap kualitas sperma Bangkok setelah *thawing*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 tingkat perlakuan dengan 5 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan yaitu pembekuan lambat DMSO 7%, pembekuan lambat DMSO 14%, pembekuan cepat DMSO 7%, pembekuan cepat DMSO 14%, dan pembekuan cepat DMSO 21%. Data dianalisis menggunakan analisis varians (ANOVA), jika ditemukan pengaruh signifikan, dilanjutkan dengan *Uji Jarak Berganda Duncan*. Sebelum pembekuan, semen segar dari ayam jantan dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Untuk perlakuan pembekuan cepat, semen tidak melalui tahap ekuilibrasi, langsung *prefreezing* dan pembekuan. Pada pembekuan lambat, semen dilakukan proses ekuilibrasi kemudian dilanjutkan ke tahap *prefreezing* dan pembekuan. Motilitas, viabilitas, dan abnormalitas dievaluasi setelah *thawing*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembekuan cepat dan lambat tidak mempengaruhi motilitas sperma (19-25%) dan abnormalitas (39,74-49,40%) pada sperma setelah *thawing*, tetapi mempengaruhi viabilitas sperma, di mana pembekuan cepat dengan konsentrasi DMSO 14% mampu meningkatkan viabilitas sperma (68,98%). Sehingga teknik pembekuan cepat berpotensi menggantikan teknik pembekuan lambat yang umumnya diterapkan dalam riset kriopreservasi semen ayam Bangkok.

**Kata kunci:** DMSO; kriopreservasi; pembekuan cepat; pembekuan lambat; sperma ayam

## Pendahuluan

Berbagai jenis ayam lokal di Indonesia telah tersebar dengan berbagai karakteristik. Ayam Bangkok adalah salah satu ayam lokal Indonesia yang populer dengan keberanian bertarung yang tinggi, postur tubuh yang tinggi dan kokoh (Cahyono, 2022). Pemeliharaan ayam lokal di masyarakat umumnya dilakukan secara ekstensif tanpa memperhatikan pola perkawinan (Khaeruddin *et al.*, 2022), sehingga dapat menghasilkan ayam Bangkok campuran dengan kualitas genetik rendah. Oleh karena itu, perlu untuk menyediakan dan mendistribusikan sperma ayam Bangkok berkualitas untuk disebarluaskan melalui teknologi kriopreservasi semen dan inseminasi buatan.

Teknologi kriopreservasi sperma pada unggas bertujuan untuk meningkatkan kualitas genetik dan pelestarian plasma nutfah. Pembekuan sperma efektif untuk mengawetkan sperma dalam jangka panjang. Selain itu, pembekuan memungkinkan pengangkutan sperma untuk diinseminasi ke ayam betina di tempat yang cukup jauh dari lokasi ayam jantan. Namun, sperma ayam lebih rentan terhadap kerusakan selama proses pembekuan karena rasio luas permukaan terhadap volume yang relatif lebih rendah dan ekor yang lebih tipis dibandingkan beberapa spesies, seperti manusia dan sapi (Mohammad *et al.*, 2021). Sehingga diperlukan teknik pembekuan yang tepat untuk mempertahankan kualitas sperma ayam hingga setelah thawing.

Laju pendinginan diduga menjadi faktor utama penyebab penurunan viabilitas pada metode kriopreservasi sperma konvensional dari spesies unggas (Woelders, 2021). Ada dua metode pembekuan konvensional yang digunakan dalam kriopreservasi spermatozoa, yaitu pembekuan lambat dan pembekuan cepat (Li *et al.*, 2019). Pada pembekuan lambat, suhu penyimpanan straw diturunkan secara perlahan. Pembekuan lambat melewati tahap penyimpanan pada suhu lemari es (ekuilibrisasi) (Ndubuisi-Ogbonna *et al.*, 2021). Namun, pembekuan lambat menyebabkan resiko kerusakan sel tinggi rusak akibat pembentukan es ekstraseluler (Siddiqui *et al.*, 2019). Proses pembekuan dapat dipercepat dengan menghilangkan tahap ekuilibrisasi, sehingga menghemat waktu yang dibutuhkan dalam proses kriopreservasi spermatozoa. Metode pembekuan cepat tanpa ekuilibrisasi telah dilaporkan efektif dalam kriopreservasi semen anjing (Kim *et al.*, 2012). Walaupun demikian, laju pendinginan yang tepat dipilih berdasarkan jenis dan

konsentrasi krioprotektan yang digunakan (Zong *et al.*, 2023).

Penambahan agen krioprotektan (CPA) dalam pengencer semen diperlukan sebelum proses pembekuan. CPA, yang biasanya berupa cairan, mengurangi kerusakan akibat pembekuan dari proses kriopreservasi, dan memengaruhi laju transportasi air, nukleasi, dan pertumbuhan kristal es (Jang *et al.*, 2017). CPA harus dapat diterima secara biologis, mampu menembus sel, dan memiliki toksisitas rendah (Pegg, 2007). Dimetil sulfoksida (DMSO) adalah krioprotektan yang mampu menembus dan mengurangi atau mencegah pembentukan es selama pembekuan. DMSO memiliki biaya rendah dan sitotoksitas yang kecil, sehingga menjadikannya kandidat yang lebih menonjol untuk kriopreservasi (Bhattacharya, 2018). Penggunaan DMSO sebagai CPA menghasilkan keberhasilan fertilisasi sperma kuda lebih baik dari gliserol (Cook *et al.*, 2020). DMSO juga dilaporkan lebih efektif dalam mempertahankan kualitas sperma ikan jika dibandingkan propilen glikol, etilen glikol (EG) dan gliserol (Zidni *et al.*, 2020). Pada kriopreservasi semen unggas, DMSO dilaporkan memiliki efek krioprotektif lebih baik dibandingkan dimetil asetat (DMA) dan etilen glikol (EG) pada sperma ayam Gaga (Wahjuningsih *et al.*, 2026).

Studi tentang perbandingan pembekuan cepat dan lambat belum pernah dilakukan pada sperma ayam lokal Indonesia. Selama ini pembekuan lambat diterapkan pada berbagai penelitian sperma ayam lokal Indonesia (Khaeruddin *et al.*, 2020; 2024; Malik *et al.*, 2018; Nugrahini *et al.*, 2019). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pembekuan cepat atau pembekuan lambat dengan berbagai konsentrasi DMSO terhadap kualitas sperma Bangkok setelah thawing.

## Materi dan Metode

### Pemeliharaan Ayam

Penelitian ini menggunakan 3 ekor ayam Bangkok jantan berumur kurang lebih dari 10 bulan dengan bobot badan antara 1,5-2,5 kg yang dipelihara dalam kandang individu berukuran 50 x 50 x 65 cm dan diberi pakan komplit yang terdiri dari jagung, dedak dan konsentrat (AD1, Japfa) sebanyak 150 g/ekor/hari serta air minum diberikan secara *ad libitum*.

## Koleksi Semen

Koleksi semen menggunakan teknik pemijatan (massage) di lokasi tulang pelvis bagian kloaka. Pijatan dilakukan sampai papilla menonjol dan diikuti dengan keluarnya semen segar (Kucera dan Heidinger, 2018), semen segar dikumpulkan menggunakan tabung kecil. Semen dikoleksi pada pagi hari dari 3 ekor ayam Bangkok kemudian disatukan dalam satu tabung dan dibagi sesuai perlakuan. Koleksi semen dilakukan sebanyak 5 kali sebagai ulangan.

## Evaluasi Semen Segar

Prosedur evaluasi semen segar dilakukan sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh Khaeruddin *et al.* (2025). Evaluasi semen segar dilakukan secara makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH semen) dan mikroskopis (konsentrasi, gerakan massa, motilitas, viabilitas dan abnormalitas sperma) menggunakan mikroskop cahaya (Boeco, Jerman). Konsentrasi sperma dihitung menggunakan Neubauer chamber (Marienfeld, Jerman) yang telah diencerkan dengan NaCl 3%. Gerakan massa dievaluasi pada perbesaran 10x dengan melihat tebal/tipis dan gerakan sperma secara bersamaan. Evaluasi motilitas (gerakan individu) sperma dilakukan secara subjektif terhadap persentase spermatozoa yang bergerak, diamati menggunakan mikroskop perbesaran 40x pada 5 lapang pandang. Viabilitas dan abnormalitas sperma diamati pada perbesaran 40x menggunakan pewarna eosin-nigrosin (Merck, Jerman).

## Persiapan Pengencer

Pengencer dasar yang digunakan berdasarkan Khaeruddin *et al.* (2024) dengan sedikit modifikasi. 90% cairan infus (KA-EN 3B<sup>®</sup>, Indonesia) dan 10% kuning telur dihomogenkan dan disentrifugasi pada 2000 rpm selama 20 menit dan peletnya dipisahkan. Kemudian supernatant ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 7%, 14% atau 21% (sesuai perlakuan), penisilin 1000 IU/ml, dan streptomisin 1 mg/ml.

## Pengenceran, Pengemasan, dan Ekuilibrase Semen

Semen diencerkan dengan rasio 1:5 kemudian dikemas dalam straw 0,25 mL (IMV, Prancis) dan dibiarkan selama 1 menit. Jumlah sperma yang dikemas dalam straw minimal 125 juta sel. Untuk perlakuan pembekuan lambat, semen yang dikemas dan ditempatkan di lemari es pada suhu  $\pm 5^{\circ}\text{C}$

selama 2 jam untuk ekuilibrase sebelum *pre-freezing*. Sementara itu, perlakuan pembekuan cepat langsung memasuki tahap *pre-freezing* tanpa melalui proses ekuilibrase.

## *Pre-freezing*, Pembekuan, dan Thawing

*Pre-freezing* dilakukan dengan meletakkan straw pada rak pembeku dengan ketinggian 3 cm dari permukaan nitrogen cair (Madeddu *et al.*, 2016) selama 10 menit (Mosca *et al.*, 2016). Pembekuan dilakukan dengan meletakkan straw di dalam kanister dan mencelupkannya ke nitrogen cair dalam kontainer selama 24 jam. Semen dithawing pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama 5 detik (Salih *et al.*, 2021; Wahjuningsih *et al.*, 2024). Evaluasi sperma post thawing dilakukan untuk mengetahui motilitas, viabilitas, dan abnormalitas.

## Desain Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 tingkat perlakuan dan 5 ulangan. Tingkat perlakuan yang digunakan adalah pembekuan lambat DMSO 7%, pembekuan lambat DMSO 14%, pembekuan cepat DMSO 7%, pembekuan cepat DMSO 14%, dan pembekuan cepat DMSO 21%. Data dianalisis untuk varians (ANOVA), jika ditemukan efek signifikan, dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan menggunakan perangkat lunak SPSS 16.

## Hasil dan Pembahasan

### Karakteristik Semen Segar

Volume semen ayam Bangkok dalam penelitian ini adalah 0,18 ml (Tabel 1), hampir sama dengan yang diperoleh oleh Hijriyanto *et al.* (2017) yaitu 0,178 ml, namun lebih rendah dari yang dilaporkan Prabewi dan Listyowati (2025) yaitu 0,3-0,57 ml. pH semen adalah 7,73 (netral) mendekati hasil Ervandi *et al.* (2020) yaitu 7,6. Viabilitas sperma adalah 90,61% lebih tinggi dari laporan sebelumnya sebesar 85,81% (Prasetyo *et al.* 2020), namun sangat mendekati yang didapatkan Asnawi *et al.* (2023) yaitu 90,2%. Motilitas sperma 87% mendekati hasil penelitian sebelumnya, yaitu 89,1% (Kudratullah dan Sudrajat, 2021; Asnawi *et al.*, 2023) bahkan lebih tinggi dari laporan Prabewi dan Listyowati (2025) yaitu 48-75,67%.

Abnormalitas sperma adalah 10,15% lebih tinggi dari yang diperoleh oleh Khaeruddin *et al.* (2021) yaitu 5,5%, namun jauh lebih rendah dari

laporan Prabewi dan Listyowati (2025) yaitu 24,33-57,00%. Sementara itu, konsentrasi spermatozoa dalam penelitian ini adalah 1,72 miliar/ml, sedikit lebih tinggi dari laporan Asnawi *et al.* (2023) yaitu 1,25 miliar/ml, namun lebih rendah dari laporan (Ervandi *et al.*, 2020), yaitu 3,47 miliar/ml. Perbedaan kualitas sperma ayam Bangkok dalam penelitian ini dengan penelitian sebelumnya dapat disebabkan oleh berbagai faktor, seperti perbedaan suhu lingkungan (Shanmugam *et al.*, 2014), frekuensi penyimpanan semen (Saridewi *et al.*, 2018), umur ayam jantan (Shanmugam *et al.*, 2014), kandungan nutrisi pakan (Mustafa *et al.*, 2017; Safari *et al.*, 2018) dan berat badan ayam jantan (Abbass *et al.*, 2017).

Tabel 1. Karakteristik semen segar dari ayam Bangkok

| Parameter                        | Rata-rata $\pm$ SEM |
|----------------------------------|---------------------|
| Volume (ml)                      | 0,18 $\pm$ 0,04     |
| Warna                            | Putih susu          |
| Konsistensi                      | Sedang              |
| pH                               | 7,73 $\pm$ 0,47     |
| Konsentrasi sperma ( $10^9$ /ml) | 1,72 $\pm$ 0,71     |
| Gerak massa sperma               | ++                  |
| Motilitas sperma (%)             | 87,00 $\pm$ 3,79    |
| Viabilitas sperma (%)            | 90,61 $\pm$ 4,75    |
| Abnormalitas sperma (%)          | 10,15 $\pm$ 3,66    |

### Motilitas Sperma *Post Thawing*

Motilitas sperma ayam Bangkok pasca pencairan tidak berbeda secara signifikan ( $P > 0,05$ ) antar perlakuan, dengan kisaran 19-25% (Tabel 2). Berdasarkan hasil penelitian ini, pembekuan cepat (tanpa ekuilibrase) dapat diterapkan untuk menghemat waktu dalam proses kriopreservasi semen ayam Bangkok karena tidak terdapat perbedaan motilitas dengan teknik pembekuan lambat. Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan Ndubuisi-Ogbonna *et al.* (2021) bahwa tidak terdapat perbedaan motilitas sperma ayam FUNAAB alpha setelah dibekukan menggunakan teknik pembekuan cepat dan lambat.

Tabel 2. Motilitas sperma *post thawing* dengan berbagai perlakuan pembekuan

| Perlakuan                 | Motilitas sperma (%)<br>(rata-rata $\pm$ SEM) |
|---------------------------|-----------------------------------------------|
| Pembekuan lambat DMSO 7%  | 20,00 $\pm$ 4,18                              |
| Pembekuan lambat DMSO 14% | 19,00 $\pm$ 4,00                              |
| Pembekuan cepat DMSO 7%   | 21,00 $\pm$ 1,87                              |
| Pembekuan cepat DMSO 14%  | 25,00 $\pm$ 2,74                              |
| Pembekuan cepat DMSO 21%  | 23,00 $\pm$ 4,06                              |

Penggunaan DMSO 7%, 14% dan 21% tidak menyebabkan perbedaan motilitas sperma setelah

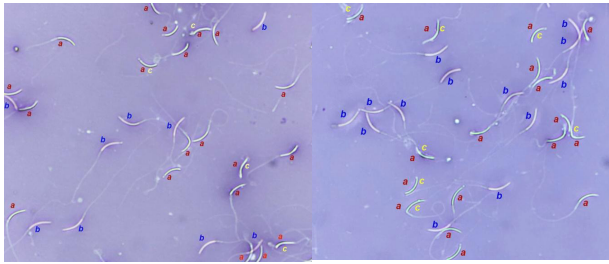
dalam penelitian ini. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa penambahan DMSO 8%, 10% dan 12% dalam pengencer Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) tidak menyebabkan perbedaan motilitas sperma ayam SK Kedu post thawing (Telnoni *et al.*, 2017). Motilitas spermatozoa pada perlakuan DMSO 14% dalam penelitian ini lebih tinggi daripada motilitas sperma ayam Bangkok dengan krioprotektan Dimetil asetat (DMA) 14% pada penelitian sebelumnya, yaitu 15,30% (Nugrahini *et al.*, 2019). Menurut Bhattacharya (2018) DMSO lebih baik digunakan sebagai krioprotektan karena memiliki sitotoksitas rendah.

Kualitas sperma menurun setelah pembekuan dalam penelitian ini dengan motilitas sperma post thawing yang cukup rendah (19-25%). Penurunan kualitas sperma setelah thawing disebabkan oleh perubahan suhu yang tiba-tiba, pembentukan es dan perubahan tekanan osmotik (Hezavehei *et al.*, 2018). Selain itu, hal ini dapat disebabkan oleh penurunan kadar adenosin trifosfat (ATP) setelah pencairan (Słowińska *et al.*, 2018). ATP berperan dalam pergerakan (motilitas) sperma (Bennison *et al.*, 2016). Studi Zong *et al.* (2025) menyatakan bahwa pembekuan menyebabkan kerusakan substansial pada struktur dan fungsi mitokondria sperma ayam, mengubah kelimpahan protein mitokondria, dan menyebabkan penurunan parameter gerakan spermatozoa. Ditambahkan oleh Sangani *et al.* (2017) bahwa progresivitas sperma ayam sebagian besar bergantung pada keseluruhan produksi energi yang berasal dari kompartemen mitokondria, sehingga defisiensi fungsi mitokondria dan produksi energi dapat menjadi penyebab motilitas progresif yang rendah.

Penelitian sebelumnya melaporkan motilitas sperma yang lebih tinggi setelah thawing di atas 50% pada berbagai ras ayam dan pengencer yang berbeda dari penelitian ini (Najafi *et al.*, 2021; Thananurak *et al.*, 2019; 2020). Sementara itu, beberapa laporan lain menunjukkan bahwa motilitas sperma berada di bawah 30% (Mosca *et al.*, 2019; Rakha *et al.*, 2020). Kemampuan pembekuan sperma ayam berbeda berdasarkan antar breed (Somtaew *et al.*, 2019).

### Viabilitas Sperma *Post Thawing*

Sperma yang masih hidup dibedakan dari sperma yang mati berdasarkan kemampuannya menyerap pewarna *eosin-nigrosin* (Gambar 1). Sperma yang membrannya masih utuh tidak menyerap pewarna yang terpapar.



Gambar 1. Hasil pewarnaan *eosin-nigrosin* pada sperma ayam setelah thawing menggunakan metode pembekuan cepat. a: Sperma hidup, b: Sperma mati, dan c: Sperma abnormal.

Perlakuan pembekuan memiliki pengaruh yang sangat signifikan ( $P < 0,01$ ) terhadap viabilitas sperma ayam Bangkok *post thawing* (Tabel 3). Viabilitas sperma pada pembekuan cepat dengan konsentrasi DMSO 14% lebih tinggi dibandingkan dengan pembekuan lambat dan pembekuan dengan konsentrasi DMSO masing-masing 7% dan 21%. Dalam penelitian ini, pembekuan cepat menyebabkan spermatozoa terpapar langsung uap nitrogen cair tanpa melewati suhu kesetimbangan. Menurut Rall dan Fahy (1985) pada pembekuan cepat, suspensi sel diubah langsung dari fase berair ke keadaan kaca setelah terpapar langsung nitrogen cair. Risiko cedera beku pada pembekuan cepat lebih rendah, sehingga memastikan tingkat kelangsungan hidup sel yang cukup tinggi. Sedangkan pembekuan lambat menyebabkan krioprotektan menggantikan air dalam sitoplasma, yang menyebabkan sel berisiko tinggi rusak karena pembentukan es ekstraseluler (Siddiqui *et al.*, 2019). Pendinginan lambat menyebabkan perubahan osmotik karena efek paparan larutan intraseluler dan ekstraseluler yang sangat pekat atau interaksi mekanis antara sel dan es ekstraseluler (Jang *et al.*, 2017). Menurut Susilawati (2011) pendinginan (ekuilibrisasi) menyebabkan stres fisik dan kimia pada membran sperma yang dapat mengurangi viabilitas dan kemampuan sperma untuk membuahi.

Tabel 3. Viabilitas sperma *post thawing* dengan berbagai perlakuan pembekuan

| Perlakuan                        | Viabilitas sperma (%)<br>(rata-rata $\pm$ SEM) |
|----------------------------------|------------------------------------------------|
| DMSO 7% yang dibekukan perlahan  | 40,72 $\pm$ 8,47 <sup>a</sup>                  |
| DMSO 14% yang dibekukan perlahan | 39,90 $\pm$ 4,54 <sup>a</sup>                  |
| Pembekuan cepat DMSO 7%          | 47,78 $\pm$ 6,96 <sup>a</sup>                  |
| Pembekuan cepat DMSO 14%         | 68,98 $\pm$ 3,50 <sup>b</sup>                  |
| Pembekuan cepat DMSO 21%         | 31,03 $\pm$ 6,60 <sup>a</sup>                  |

Keterangan: Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $P < 0,01$ )

Pada pembekuan lambat, penggunaan DMSO 7% dan 14% tidak menyebabkan perbedaan viabilitas sperma. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa penggunaan DMSO 8%, 10% dan 12% tidak menyebabkan perbedaan viabilitas sperma ayam SK Kedu setelah pencairan (Telnoni *et al.*, 2017). Viabilitas sperma ayam Bangkok menggunakan DMSO 14% dalam penelitian ini adalah 68,98% lebih tinggi dibandingkan laporan sebelumnya yang menggunakan DMSO 14%, yaitu 22% (Nugrahini *et al.*, 2019). Jika dibandingkan dengan penggunaan DMSO 7% dalam penelitian ini, penelitian sebelumnya melaporkan viabilitas yang lebih tinggi sebesar 55% pada sperma ayam hutan merah setelah thawing menggunakan DMSO 8% dengan teknik pembekuan lambat (Rakha *et al.*, 2018). Demikian pula, Khaeruddin *et al.* (2020) melaporkan bahwa viabilitas sperma ayam lokal Indonesia adalah 44,62% menggunakan DMSO 7% setelah *thawing*.

DMSO adalah molekul amfipatik kecil dengan dua gugus metil nonpolar dan satu gugus sulfoksida polar yang memungkinkannya untuk dengan mudah menembus membran sel dan secara efektif mencegah pembentukan kristal es intraseluler, sehingga mengurangi cedera akibat kriopreservasi (Crowley *et al.*, 2021). DMSO berdifusi bebas ke dalam sel, menyebabkan dehidrasi sel, dan menggantikan air intraseluler (Elliot *et al.*, 2017). DMSO memberikan perlindungan bagi spermatozoa dengan mengurangi kerusakan ultrastruktural, kerusakan oksidatif, dan kerusakan DNA yang disebabkan oleh kriopreservasi (Zhang *et al.*, 2024).

Viabilitas sperma setelah *thawing* dengan teknik pembekuan lambat dalam penelitian ini cukup rendah. Selama pembekuan dan pencairan, spermatozoa dapat terpapar stres osmotik yang mengakibatkan penurunan viabilitas. Sperma berada dalam lingkungan hipertonik karena pembentukan es ekstraseluler, hal ini karena konsentrasi zat terlarut dalam fraksi ekstraseluler yang tidak membeku meningkat. Kondisi ini menyebabkan dehidrasi sel karena pengangkutan air keluar dari sel untuk menjaga keseimbangan antara konsentrasi zat terlarut intra dan ekstraseluler (Partyka *et al.*, 2012). Selama pencairan, proses sebaliknya terjadi di mana sperma terpapar kondisi hipotonik yang mengakibatkan penyerapan air dan pembengkakan (Pegg, 2007). Kriopreservasi menyebabkan penurunan integritas membran plasma, integritas akrosom, dan aktivitas mitokondria sperma ayam (Partyka *et al.*, 2012). Selain itu, kriopreservasi

sperma ayam juga meningkatkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan peroksidasi lipid (Nguyen *et al.*, 2015). Ketika kadar ROS meningkat, PUFA dalam membran sperma teroksidasi dalam proses yang dikenal sebagai peroksidasi lipid, yang menghasilkan produk sampingan beracun yang dapat merusak membran sperma, mengurangi fluiditasnya dan mengganggu motilitas dan fungsi sperma (Wang dan Li, 2025). Kandungan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) tinggi dalam membran sperma (Craig *et al.*, 2019). Hal ini membuatnya sangat rentan terhadap peroksidasi lipid oleh ROS yang menyebabkan hilangnya integritas membran dan mengganggu fungsi sperma (Wang dan Li, 2025).

### Abnormalitas Sperma Post Thawing

Perlakuan pembekuan tidak berpengaruh ( $P>0,05$ ) terhadap abnormalitas sperma ayam Bangkok pasca pencairan yang berkisar antara 39,74-49,40% (Tabel 4). Studi ini menunjukkan bahwa pembekuan sperma cepat (tanpa ekuilibrasi) adalah metode baru yang dapat diterapkan untuk kriopreservasi semen ayam Bangkok karena tidak menyebabkan perbedaan abnormal dengan teknik pembekuan lambat.

Tabel 4. Kelainan sperma post thawing dengan berbagai perlakuan pembekuan

| Perlakuan                        | Abnormalitas sperma (%) (rata-rata $\pm$ SEM) |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|
| DMSO 7% yang dibekukan perlahan  | 43,36 $\pm$ 9,06                              |
| DMSO 14% yang dibekukan perlahan | 49,40 $\pm$ 8,10                              |
| Pembekuan cepat DMSO 7%          | 39,74 $\pm$ 12,58                             |
| Pembekuan cepat DMSO 14%         | 44,59 $\pm$ 4,10                              |
| Pembekuan cepat DMSO 21%         | 40,49 $\pm$ 4,19                              |

Jenis sperma abnormal yang umum ditemukan dalam penelitian ini adalah pembengkokan di bagian tengah (Gambar 1). Sperma bengkok merupakan kelainan semen ayam yang sering ditemui dan disebabkan oleh pengenceran semen, penurunan suhu semen, dan kondisi osmotik yang tidak menguntungkan (Clarke *et al.*, 1984). Abnormalitas sperma ayam Bangkok dengan teknik pembekuan lambat DMSO 14% dalam penelitian ini adalah 49,4% lebih rendah dibandingkan laporan sebelumnya, yaitu 67,20% menggunakan krioprotektan DMA 14% (Nugrahini *et al.*, 2019). Namun, beberapa laporan menggambarkan abnormalitas sperma ayam dengan berbagai jenis cukup rendah setelah thawing, yaitu 2,15-3,02% (Murugesan dan Mahapatra, 2020), 8,6-16,5% (Najafi *et al.*, 2019), 14,3-20,4% (Najafi *et al.*, 2021), dan 17,01-37,12% (Najafi *et al.*, 2020).

Persentase sperma abnormal dalam penelitian ini meningkat setelah thawing. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa proporsi sperma unggas dengan morfologi abnormal meningkat karena pembekuan dan pencairan (Najafi *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2018; Zhilinsky *et al.*, 2019). Peningkatan jumlah sperma abnormal berkorelasi dengan penurunan jumlah spermatozoa motil pada ayam (Feyisa *et al.*, 2018). Abnormalitas sperma dapat disebabkan oleh kerusakan pada beberapa bagian sperma. Pembekuan dan pencairan menyebabkan kerusakan membran plasma, pembengkakan mitokondria, dan kerusakan akrosom pada sperma ayam (Olexikova *et al.*, 2018). Proses pembekuan dan pencairan menyebabkan pelonggaran hubungan antara inti sel dan bagian tengah sperma, kelainan pada membran selubung mitokondria, dan erupsi plasma di sekitar hubungan antara bagian tengah dan leher sperma (Shi *et al.*, 2014). Stres osmotik merupakan faktor penting yang menyebabkan kerusakan pada sperma, terutama membrannya (Peña *et al.*, 2011). Kerusakan sperma dapat disebabkan oleh kriopreservasi, karena sel-sel terpapar stres osmotik yang parah selama pembekuan dan pencairan (Sieme *et al.*, 2015).

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pembekuan cepat dan lambat tidak mempengaruhi motilitas dan abnormalitas sperma ayam Bangkok setelah pencairan, tetapi mempengaruhi viabilitas sperma, dimana pembekuan cepat dengan konsentrasi DMSO 14% mampu meningkatkan viabilitas sperma. .

### Daftar Pustaka

- Abbass, W., Jabbar, A., Riaz, A., Akram, M., & Ditta, Y.A. (2017). Effect of plumage color and body weight on the semen quality of Naked Neck chicken. *The Journal of World's Poultry Research*, 7(3), 129–133.
- Asnawi, A., Maskur, M., Dradjat, A.S., & Muhsinin, M. (2023). Semen evaluation, preparation of Bangkok roosters, and insemination to indonesian native hens. *Jurnal Biologi Tropis*, 23(4), 722-729. <https://doi.org/10.29303/jbt.v23i4.5779>
- Bennison, C., Hemmings, N., Brookes, L., Slate, J., & Birkhead, T. (2016). Sperm morphology, adenosine triphosphate (ATP) concentration and swimming velocity:

- unexpected relationships in a passerine bird. *Proceedings of Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1837), 20161558. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1558>
- Bhattacharya, S. (2018). Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. In *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. Bozkurt Y (Editors), Intech. London.
- Cahyono, B. (2022). *Budidaya Ayam Bangkok*. Mutiara Aksara, Semarang.
- Clarke, R.N., Bakst, M.R., & Ottinger, M.A. (1984). Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. *Poultry Sciences*, 63(4), 801–805. <https://doi.org/10.3382/ps.0630801>
- Cook, N. L., Masterson, K. R., Battaglia, D., Beck, R., & Metcalf, E. S. (2020). Dimethyl sulfoxide and glycerol as cryoprotectant agents of stallion semen: effects on blastocyst rates following intracytoplasmic sperm injection of IVM equine oocytes. *Reproduction Fertility and Development*, 32(3), 253–258. <https://doi.org/10.1071/RD19266>
- Craig, L. B., Brush, R. S., Sullivan, M. T., Zavy, M. T., Agbaga, M. P., & Anderson, R. E. (2019). Decreased very long chain polyunsaturated fatty acids in sperm correlates with sperm quantity and quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(7), 1379–1385. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01464-3>
- Crowley, C. A., Smith, W. P., Seah, K. M., Lim, S. K., & Khan, W. S. (2021). Cryopreservation of human adipose tissues and adipose-derived stem cells with DMSO and/or trehalose: a systematic review. *Cells*, 10(7), 1837. <https://doi.org/10.3390/cells10071837>
- Ervandi, M., Ardiansya, W., & Prahara, S. (2020). Kualitas dan fertilitas spermatozoa sebagai akibat pejantan berbeda. *Jambura Journal of Animal Science*, 2(2), 29–37. <https://doi.org/10.35900/jjas.v2i2.4533>
- Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74–91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>
- Feyisa, S.G., Park, Y.H., Kim, Y.M., Lee, B.R., Jung, K.M., Choi, S.B., Cho, C.Y., & Han, J.Y. (2018). Morphological defects of sperm and their association with motility, fertility, and hatchability in four Korean native chicken breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(8), 1160–1168. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0626>
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H.M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hijriyanto, M., Dasrul, D., & Thasmi, C.N. (2017). Pengaruh frekuensi penampungan semen terhadap kualitas spermatozoa pada ayam bangkok. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 1(1), 46–53.
- Jang, T.H., Park, S.C., Yang, J.H., Kim, J.Y., Seok, J.H., Park, U.S., Choi, C.W., Lee, S.R., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
- Khaeruddin, K., Ciptadi, G., Yusuf, M., Hermawansyah, H., Sahiruddin, S., & Wahjuningsih, S. (2024). Effect of addition of glucose or fructose in three types of crystalloid fluid on spermatozoa quality of Gaga' chicken from South Sulawesi, Indonesia. *Pakistan Journal of Zoology*, 56(5), 2441–2448. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20211128011130>
- Khaeruddin, K., Hermawansyah, H., Syamsuryadi, B., & Junaedi, J. (2021). Studi morfometrik dan morfologi spermatozoa enam rumpun ayam lokal Indonesia. *Jurnal Kajian Veteriner*, 9(3), 123–134. <https://doi.org/10.35508/jkv.v9i3.5171>
- Khaeruddin, K., Junaedi, J., & Hastuti, H. (2020). Cryopreservation of Indonesian native chicken semen by using dimethyl sulfoxide and various level of ethylene glycol as cryoprotectants. *Biodiversitas*, 21(12), 5178–5722. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211231>
- Khaeruddin, K., Syamsuryadi, B., Fattah, A.H., & Hermawansyah, H. (2025). *Teknologi Reproduksi Ternak Jantan*. Sonpedia, Jambi.

- Khaeruddin, K., Syamsuryadi, B., Fattah, A. H., Kurniawan, M. E., Nurfiana, R., Irsang, I., & Pardi, P. (2022). Introduksi teknologi inseminasi buatan pada unggas lokal di Desa Barambang Kecamatan Sinjai Borong Kabupaten Sinjai. *Abdimas Galuh*, 4(2), 1292-1302. <http://dx.doi.org/10.25157/ag.v4i2.8515>
- Kim, S., Lee, Y., Yang, H., & Kim, Y.J. (2012). Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. *Animal Reproduction Science*, 130(1-2), 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.12.014>
- Kucera, A. C., & Heidinger, B. J. (2018). Avian semen collection by cloacal massage and isolation of DNA from sperm. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 132, 55324. <https://doi.org/10.3791/55324>
- Kudratullah, K., & Sudrajat, A.S. (2021). Motilitas, viabilitas, dan morfologi spermatozoa ayam Bangkok dengan pengencer dextrose dan NaCl fisiologis 10% pada penyimpanan suhu 5 °C dan 26 °C. *Indonesian Journal of Applied Science and Technology*, 2(1), 1-9.
- Li, Y., Zhou, L., Lv, M., Ge, P., Liu, Y., & Zhou, D. (2019). Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation : A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 233, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.11.028>
- Madeddu, M., Mosca, F., Sayed, A.A., Zaniboni, L., Mangiagalli, M.G., Colombo, E., & Cerolini, S. (2016). Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Animal Reproduction Sciences*, 171, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.05.014>
- Malik, A., Shahdan, M., Zakir, M. I., Sasongko, N., & Sakiman, S. (2018). Penambahan minyak ikan dalam pengencer skim milk-egg yolk terhadap motilitas dan abnormalitas ayam kampung pasca thawing. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan*, 21(2), 55-69. <https://doi.org/10.22437/jiip.v21i2.5823>
- Miranda, M., Kulíková, B., Vašíček, J., Olexiková, L., Iaffaldano, N., & Chrenek, P. (2018). Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 93-100. <https://doi.org/10.1111/rda.13070>
- Mohammad, M. S., Mardenli, O., & Amin AL-Tawash, A. S. (2021). Evaluation of the cryopreservation technology of poultry sperm: A review study. *IOP Conference Series: Earth Environmental Science*, 735, 12016. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/735/1/012016>
- Mosca, F., Madeddu, M., Sayed, A.A., Zaniboni, L., Iaffaldano, N., & Cerolini, S. (2016). Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology*, 73(3), 343-347. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.001>
- Mosca, F., Zaniboni, L., Sayed, A.A., Madeddu, M., Iaffaldano, N., & Cerolini, S. (2019). Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen / thawed chicken semen. *Poultry Science*, 98(11), 6071-6077. <https://doi.org/10.3382/ps/pez303>
- Murugesan, S., & Mahapatra, R. (2020). Cryopreservation of Ghagus chicken semen: Effect of cryoprotectants, diluents and thawing temperature. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(8), 951-957. <https://doi.org/10.1111/rda.13734>
- Mustafa, M., Dasrul, D., Yaman, M.A., Wahyuni, S., & Sabri, M. (2017). Pengaruh pemberian kombinasi pakan fermentasi dengan multi enzim dan vitamin E dalam ransum terhadap peningkatan kualitas semen ayam Arab. *Agripet*, 17(1), 43-52. <https://doi.org/10.17969/agripet.v17i1.6576>
- Najafi, A., Kia, H.D., & Hamishehkar, H. (2021). Does alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carriers improve post-thawed sperm quality and ameliorate apoptosis-related genes of rooster sperm ?. *Poultry Science*, 100(1), 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.007>
- Najafi, A., Taheri, R.A., Mehdipour, M., & Mart, F. (2019). Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. *Poultry Science*, 98, 440-446. <https://doi.org/10.3382/ps/pey353>
- Najafi, D., Taheri, R.A., Najafi, A., Shamsollahi, M., & Alvarez-Rodriguez, M. (2020). Effect

- of astaxanthin nanoparticles in protecting the post-thawing quality of rooster sperm challenged by cadmium administration. *Poultry Science*, 99(3), 1678–1686. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.006>
- Ndubuisi-Ogbonna, L.C., Daramola, J.O., Akintunde, A.O., Abdullah, A.R., Wheto, M., & Afodu, O.J. (2021). Influence of different cryoprotocols and strains on the sperm viability of FUNAAB Alpha chickens. *Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences*, 8(1), 44–54. <https://doi.org/10.9734/ajravs/2021/v4i3148>
- Nguyen, T.M.D., Seigneurin, F., Froment, P., Combarnous, Y., & Blesbois, E. (2015). The 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the augmentation of antioxidant defenses in cryopreserved chicken sperm. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134420>
- Nugrahini, Y.L.R.E., Ismaya, I., & Harimurti, S. (2019). The effects of different DMA level on sperm quality of Bangkok chicken offspring. *Journal of Livestock Science and Production*, 3(1), 131–135. <https://doi.org/10.31002/jalspro.v3i1.1369>
- Olexikova, L., Miranda, M., Kulikova, B., Baláži, A., & Chrenek, P. (2019). Cryodamage of plasma membrane and acrosome region in chicken sperm. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 48(1), 33–39. <https://doi.org/10.1111/ahc.12408>
- Partyka, A., Łukaszewicz, E., & Nizański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77, 1497–1504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006>
- Pegg, D.E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*, 368, 39–57. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_3)
- Peña, F.J., García, B.M., Samper, J.C., Aparicio, I.M., Tapia, J.A., & Ferrusola, C.O. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols?. *Theriogenology*, 76(7), 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.023>
- Prabewi, N., & Listyowati, A.A. (2025). Kualitas semen ayam pejantan bangkok (*Gallus domesticus*) sebagai induk pejantan pembibit dengan penambahan kecambah kacang hijau dari berbagai umur perkecambahan. *Jurnal Penelitian Peternakan Terpadu*, 7(2), 145–149. <https://doi.org/10.36626/jppt.v7i2.1489>
- Prasetyo, A.A., Muchlis, D., & Nurcholis, N. (2020). Persentase motilitas dan viabilitas semen ayam bangkok terekuilibrasi pada suhu 5 °C. *Musamus Journal of Livestock Science*, 3(2), 1–6.
- Rakha, B.A., Ansari, M.S., Akhter, S., Akhter, A., & Blesbois, E., & Santiago-moreno J. (2020). Effect of j/dimethylformamide on sperm quality and fertilizing ability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). *Theriogenology*, 149, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.023>
- Rakha, B.A., Ansari, M.S., Akhter, S., Zafar, Z., Naseer, A., Hussain, I., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). *Theriogenology*, 122, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.003>
- Rall, W.F., & Fahy, G.M. (1985). Ice free cryopreservation of mouse embryos at 196°C by vitrification. *Nature*, 313, 573–575. <https://doi.org/10.1038/313573a0>
- Safari, A.R., Shariatmadari, F., Sharafi, M., Karimi, T.M.A., & Shahverdi, A. (2018). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Ross breeder roosters fed a diet supplemented with a moderate ratio of n-3: n-6 fatty acids. *Poultry Science*, 97(11), 4113–4121. <https://doi.org/10.3382/ps/pey278>
- Salih, S.A., Daghigh-Kia, H., Mehdipour, M., & Najafi, A. (2021). Does ergothioneine and thawing temperatures improve rooster semen postthawed quality?. *Poultry Science*, 100(10), 101405. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101405>
- Sangani, A. K., Masoudi, A. A., & Torshizi, R. V. (2017). Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow-and fast-growing roosters. *Poultry Science*, 96(1), 211–219. <https://doi.org/10.3382/ps/pew273>

- Saridewi, I.G.A.M., Budiasa, M.K., & Trilaksana, I.G.N.B. (2018). Pengaruh frekuensi penampungan semen terhadap volume, konsentrasi dan motilitas spermatozoa ayam Pelung. *Indonesia Medicus Veterinus*, 7(5), 461-465.
- Shanmugam, M., Vinoth, A., Rajaravindra, K.S., & Rajkumar, U. (2014). Evaluation of semen quality in roosters of different age during hot climatic condition. *Animal Reproduction Science*, 145(1-2), 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.015>
- Shi, L., Ren, Y., Zhou, H., Hou, G., Xun, W., Yue, W., Zhang, C., & Yang, R. (2014). Effect of rapid freezing-thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of Chinese Taihang black goat spermatozoa. *Micron*, 57, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.09.004>
- Siddiqui, M.S.I., Giasuddin, M., Chowdhury, S.M.Z.H., Islam, M.R., & Chowdhury, E.H. (2019). Effect of slow and rapid freezing method on the viability of cryopreserved vero cells. *Global Academic Journal of Pharmacy and Drug Research*, 1(1), 10-13. <https://doi.org/10.36348/gajpdr.2019.v01i01.003>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W.F. (2015). Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(S3), 20-26. <https://doi.org/10.1111/rda.12594>
- Słowińska, M., Liszewska, E., Judycka, S., Konopka, M., & Cierieszko, A. (2018). Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in liquid stored and cryopreserved turkey (*Meleagris gallopavo*) spermatozoa. *Poultry Science*, 97(10), 3709-3717. <https://doi.org/10.3382/ps/pey209>
- Somtaw, S., Sonseeda, P., Tubtintong, N., Phasuk, Y., & Vongpralub, T. (2019). Comparison of sperm freezability and fertility among Hmong Black-Bone, Barred Plymouth Rock and Thai Native (Pradu Hang Dam) chickens. *The Thai journal of Veterinary Medicine*, 48(4), 595-602.
- Susilawati, T. (2011). *Spermatology*. UB Press, Malang.
- Telnoni, S.P., Arifiantini, R.I., Yusuf, T.L., & Darwati, S. (2017). SK Kedu semen cryopreservation in Beltsville Poultry Semen Extender and Lactated Ringer's-egg yolk extender using dimethyl sulfoxide. *Asian Journal of Poultry Science*, 11(1), 14-19. <https://doi.org/10.3923/ajpsaj.2017.14.19>
- Thananurak, P., Chuaychu-noo, N., Phasuk, Y., & Vongpralub, T. (2020). Comparison of TNC and standard extender on post-thaw quality and in vivo fertility of Thai native chicken sperm. *Cryobiology*, 92, 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.01.011>
- Thananurak, P., Chuaychu-noo, N., Thélie, A., & Phasuk, Y. (2019). Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm. *Poultry Science*, 99, 1185-1198. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.040>
- Wahjuningsih, S., Arif, A.A., Khaerudin, P.H., Putri, A.R.I. (2024). The effects of equilibration time and post-thawing temperatures in cryopreservation of Gaga chicken semen. *Advanced in Animal and Veterinary Sciences*, 12(5), 807-814. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2024/12.5.807.814>
- Wahjuningsih, S., Khaeruddin, Rachmawati, A., Tribudi, Y. A., Sari, A. P. Z. N. L., Wahju Nursita, I., & Iustitia Sitaresmi, P. (2026). Pioneering comparative analysis of intracellular cryoprotectants on Gaga chicken sperm quality during cryopreservation. *Journal of Applied Animal Research*, 54(1), 2628620. <https://doi.org/10.1080/09712119.2026.2628620>
- Wang, Y., Fu, X., & Li, H. (2025). Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1520835. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.520835>
- Woelders, H. (2021). Cryopreservation of Avian Semen. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*. Wolkers, W.F., & Oldenhof, H. (Ed). vol 2180. Humana, New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_16)
- Zhang, Y., Liu, D., Wang, Q., Ruan, Q., Hua, S., Zhang, W., Yang, S., & Meng, Z. (2024). Addition of cryoprotectant DMSO reduces damage to

- spermatozoa of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) during cryopreservation: Ultrastructural damage, oxidative damage and DNA damage. *Animals*, 14(18), 2652.
- Zhilinsky, M.A., Tomgorova, E.K., Iolchiev, B.S., Vetokh, A.N., Ashraf, H.V., Volkova, N.A., Zinovieva, N.A., & Bagirov, V.A. (2019). PSXIII-2 Cryopreservation effect on biological parameters of poultry semen. *Journal of Animal Science*, 97(Suppl 3): 372–373. <https://doi.org/10.1093/jas/skz258.742>
- Zidni, I., Lee, Y. H., Park, J. Y., Lee, H. B., Hur, J. W., & Lim, H. K. (2020). Effects of cryoprotective medium composition, dilution ratio, and freezing rates on spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm cryopreservation. *Animals*, 10(11), 2153. <https://doi.org/10.3390/ani10112153>
- Zong, Y., Li, Y., Sun, Y., Han, X., Yuan, J., Ma, L., Ma, H., & Chen, J. (2025). Mitochondrial aspartate aminotransferase (GOT2) protein as a potential cryodamage biomarker in rooster spermatozoa cryopreservation. *Poultry Science*, 104(2), 104690. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104690>
- Zong, Y., Li, Y., Sun, Y., Mehaisen, G. M., Ma, T., & Chen, J. (2023). Chicken sperm cryopreservation: review of techniques, freezing damage, and freezability mechanisms. *Agriculture*, 13(2): 445. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020445>