



## Karakteristik Semen Segar dan Motilitas Spermatozoa Ayam Hutan Merah (*Gallus gallus*) dalam Pengencer yang Mengandung Air Tebu

**Arsyad<sup>1</sup>, Muhammad Erik Kurniawan<sup>1</sup>, Khaeruddin<sup>1\*</sup>, Bahri Syamsuryadi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai.

Jl. Teuku Umar No. 8, Sinjai Utara 92611, Sulawesi Selatan, Indonesia

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

### INFORMASI ARTIKEL

Diterima 03 Desember

2021

Hasil revisi diterima 21

Desember 2021

Diterbitkan 21

Desember 2021

Publish online 21

Desember 2021

Kata-kata kunci:

Air tebu;

Pengencer Semen;

Spermatozoa;

Ayam Hutan Merah;

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui level air tebu terbaik untuk ditambahkan dalam pengencer semen ayam hutan merah berbasis ringer laktat kuning telur. Semen dikoleksi menggunakan metode pemijatan dan semen segar dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen dibagi ke dalam lima tabung yang masing-masing berisi pengencer ringer laktat kuning telur, ringer laktat kuning telur + air tebu 10%, ringer laktat kuning telur + air tebu 20%, ringer laktat kuning telur + air tebu 30%, ringer laktat kuning telur + air tebu 40%. Semen disimpan dalam *refrigerator* selama 24 jam kemudian dilakukan evaluasi motilitas spermatozoa (progresif, reverse, vibrator, total). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan level air tebu dalam pengencer berpengaruh sangat nyata ( $P<0.01$ ) terhadap motilitas progresif, motilitas *reverse* dan motilitas total. Penambahan level air tebu 10% dan 20% menghasilkan motilitas total paling tinggi yaitu 86.24-88.79%. Namun, motilitas progresif tertinggi didapatkan pada penggunaan level air tebu 20% yaitu 77.67%. Kesimpulan penelitian ini adalah air tebu 20% dapat ditambahkan dalam pengencer ringer laktat kuning telur untuk mempertahankan motilitas total dan motilitas progresif spermatozoa ayam hutan merah selama penyimpanan 24 jam.

### ARTICLE INFO

#### Article history

Received 03 December 2021

Received in revised from 21 December 2021

Accepted 21 December 2021

Available online. 21 December 2021

### ABSTRACT

This study aims to determine the best level of sugarcane juice to be added to red jungle fowl semen diluent based on egg yolk lactate. Semen was collected using the massage method and fresh semen was evaluated macroscopically and microscopically. Semen was divided into five tubes, each containing Ringer's lactate egg yolk, Ringer's lactate egg yolk + sugarcane juice 10%, Ringer lactate egg yolk + sugarcane juice 20%, Ringer lactate egg yolk + sugarcane juice 30%, Ringer lactate egg yolk + sugarcane juice 40%. Semen was stored in the refrigerator for 24 hours and then the spermatozoa motility was evaluated (progressive, reverse, vibrator, total).

**Key Words:**

Sugarcane water;  
Semen diluent;  
Spermatozoa;  
Red jungle fowl;

The results showed that the treatment of sugarcane juice level in the diluent had a very significant effect ( $P<0.01$ ) on progressive motility, reverse motility and total motility. The addition of 10% and 20% sugarcane juice levels resulted in the highest total motility, namely 86.24-88.79%. However, the highest progressive motility was found in the use of 20% sugarcane juice level, which was 77.67%. The conclusion of this study is that 20% sugarcane juice can be added to Ringer's lactate egg yolk diluent to maintain total motility and progressive motility of red jungle fowl spermatozoa during 24 hours storage.

## **PENDAHULUAN**

Ayam hutan merah (*Gallus gallus*) di Indonesia merupakan jenis ayam liar yang banyak diburu sehingga membutuhkan perhatian serius untuk melestarikannya. Ayam ini memiliki arti penting bagi masyarakat karena merupakan nenek moyang ayam lokal yang menyebar di berbagai pulau di Indonesia bahkan dunia. Menurut Setianto *et al.* (2016) ayam hutan merah sudah sulit ditemukan di alam karena adanya kerusakan habitat, perburuan yang tidak terkendali dan dimangsa predator yang diperkirakan sebagai penyebab penurunan populasi ayam hutan merah yang mengarah pada kepunahan. Meskipun demikian, status konservasi ayam hutan merah masih tergolong beresiko rendah (*least concern*) (Bird Life International, 2021). Namun, jika perburuan dan perusakan habitat terus dilakukan tanpa upaya pelestarian maka akan menyebabkan ayam ini terancam punah.

Ayam hutan merah jantan memiliki sifat kualitatif berupa warna bulu didominasi oleh kombinasi warna merah kecoklatan, kuning dan hitam. Bulu kepala, punggung dan sebagian sayap berwarna merah kecoklatan, bulu leher merah kecoklatan dan kuning emas, bulu ekor, dada dan sebagian sayap berwarna hitam. Kemurnian ayam hutan merah dilihat dari kerlip bulu emas, warna shank hitam/abu-abu dan bentuk jengger tunggal (Tantu, 2007).

Upaya pelestarian dapat dilakukan dengan pengawetan spermatozoa sehingga dapat digunakan ketika ayam tersebut di ambang kepunahan. Pembekuan spermatozoa dalam nitrogen adalah hal lazim dilakukan untuk pengawetan semen. Namun jika tidak

ditunjang oleh bahan pengencer yang sesuai maka dapat meningkatkan tingkat kematian spermatozoa setelah pencairan kembali (*thawing*). Sehingga dibutuhkan kajian yang mendalam mengenai komposisi pengencer yang mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa dan tidak mengandung toksik yang berbahaya bagi spermatozoa.

Bahan pengencer sebaiknya murah dan mudah dijangkau. Beberapa peneliti telah mencoba menggunakan bahan pengencer kimia maupun pengencer alternatif dari bahan-bahan alami. Pengencer yang umum digunakan dalam pengenceran semen ayam di Indonesia yaitu ringer laktat atau air kelapa yang disuplementasi kuning telur, karbohidrat dan antioksidan (Octa *et al.*, 2014; Magfira *et al.*, 2017; Telnoni *et al.*, 2017, Iswati *et al.*, 2017; Malik *et al.*, 2018; Khaeruddin dan Srimaharani, 2019; Khaeruddin dan Kurniawan, 2020). Pada pengencer semen ayam dibutuhkan adanya gula karena kurangnya komponen gula fruktosa yang terdapat secara alami dalam semen ayam yaitu 4 mg/100 ml semen (Getachew, 2016). Sedangkan gula merupakan sumber energi yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk pergerakan.

Tebu merupakan tanaman tropis yang dijadikan bahan baku pembuatan gula di Indonesia karena kandungan sukrosanya yang tinggi. Menurut Casu *et al.* (2002) Batang tanaman tebu dapat mengakumulasi sukrosa 12-16% dari berat basahnya dan 50% dari berat kering batang tebu. Pada penelitian Bardan *et al.* (2009), penggunaan kombinasi air tebu dengan kuning telur dalam pengencer mampu mempertahankan motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa

sapi bali pada penyimpanan suhu 5 °C selama 96 jam, air tebu dapat digunakan dengan persentase sebesar 30% hingga 40%. Penggunaan air tebu sebagai pengencer semen ayam belum pernah dilakukan, mengingat potensi air tebu sebagai pengencer semen ayam sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh level air tebu untuk substitusi ringer laktat kuning telur terhadap motilitas spermatozoa ayam hutan merah. Pengencer terbaik dalam penelitian ini diharapkan menjadi pengencer dasar dalam teknologi pembekuan semen ayam hutan.

## METODE PENELITIAN

### Pemeliharaan Ayam

Ayam hutan merah sebagai sumber semen dipelihara dalam kandang individu dengan ukuran 40 x 50 x 70 cm yang diberikan ransum komplit 150 gr/ekor/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

### Penyiapan Pengencer

Pengencer dasar dibuat dengan mencampur ringer laktat 90% dengan kuning telur 10% kemudian disentrifius dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit (Khaeruddin *et al.*, 2020b). Endapan dibuang dan supernatan diambil sebagai pengencer. Pengambilan sari air tebu dimulai dengan menghaluskan batang tebu yang telah dicacah menggunakan food processor kemudian dilakukan penyaringan air tebu. Air tebu tersebut disubtitusikan ke dalam pengencer dasar sebanyak 10%, 20%, 30% dan 40%. Selanjutnya ditambahkan penisilin 1000 IU/ml dan streptomisin 1 mg/ml.

### Penampungan Semen

Penampungan semen dilakukan pada jam 8 pagi dengan metode pengurutan (*massage*) pada bagian tulang pubis secara halus hingga papilla menonjol. Semen ditampung menggunakan *spoid tuberculin* 1 ml.

### Pengenceran Semen dan Penyimpanan

Semen diencerkan dengan perbandingan pengencer adalah 1:5. Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 5 °C selama 24 jam.

### Parameter Penelitian

Parameter Penelitian ini yaitu karakteristik semen segar ayam secara makroskopis (volume, pH, warna dan konsistensi semen) dan mikroskopis (konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa). Parameter yang diamati pada semen cair yaitu motilitas total, progresif, *reverse*, dan *vibrator*. Pengamatan motilitas spermatozoa tersebut dilakukan pada mikroskop cahaya (Boeco, Jerman) perbesaran 40x16 pada 10 lapang pandang.

### Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 taraf perlakuan dan 5 kali ulangan. Data dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA), jika ditemukan pengaruh yang signifikan ( $P < 0.05$ ) maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Segar

Volume semen ayam hutan merah pada penelitian ini relatif rendah yaitu 0.09 ml. Namun laporan sebelumnya menunjukkan hasil yang lebih rendah yaitu 0.025 ml pada ayam hutan merah umur 6-18 bulan (Rakha *et al.*, 2017). Volume semen ayam domestik relatif tinggi yaitu 0.24 ml (Hambu *et al.* (2016), 0.39 ml (dos Santos *et al.*, 2018), 0.86 ml (Rochmi dan Sofyan, 2019), 0.25 ml (Khaeruddin *et al.*, 2020a), dan 0.38 ml (Du *et al.*, 2021).

Hasil pengamatan warna semen ayam hutan agak bening dengan konsistensi sedang. Menurut Soepriyana *et al.* (2006), warna dan konsistensi semen ini menentukan konsentrasi

**Tabel 1. Karakteristik semen segar ayam hutan merah**

Parameter	Rerata ± SD
Volume semen (ml)	0.09±0.04
Warna semen	Bening-putih susu
Konsistensi semen	Sedang
pH semen	7.95±0.38
Konsentrasi spermatozoa per ml ( $\times 10^9$ )	1.19±0.20
Konsentrasi spermatozoa per ejakulat ( $\times 10^9$ )	0.10±0.06
Gerakan massa spermatozoa	+
Motilitas spermatozoa (%)	86.25±2.50
Viabilitas spermatozoa (%)	95.86±2.77
Abnormalitas spermatozoa (%)	14.89±2.63

spermatozoa, bila semen kental dan berwarna putih pekat maka konsentrasi sperma tinggi, sebaliknya bila semen encer dan berwarna bening maka konsentrasinya rendah. Hal ini terlihat pada konsentrasi spermatozoa pada penelitian ini yang cukup rendah (Tabel 1). pH semen sedikit lebih tinggi dari pH semen ayam domestik yang dilaporkan sebelumnya yaitu 6.7-7.59 (Hu *et al.*, 2013; Mphaphati *et al.*, 2016; Tesfay *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2021).

Malik *et al.* (2013) menunjukkan perbedaan dengan penelitian ini yaitu volume semen dan konsentrasi spermatozoa ayam hutan merah masing-masing 0.33 ml dan 4.44 milyar/ml yang lebih tinggi daripada volume semen dan konsentrasi spermatozoa ayam domestik. Perbedaan karakteristik semen ayam hutan merah dipengaruhi oleh umur ayam, lingkungan (musim) dan frekuensi penampungan (Rakha *et al.*, 2015; Rakha *et al.*, 2017). Sedangkan konsentrasi spermatozoa dipengaruhi oleh sistem pemeliharaan ayam (Du *et al.*, 2021).

#### **Motilitas Spermatozoa Ayam Hutan Merah dengan Berbagai Level Air Tebu dalam Pengencer**

Hasil penelitian (Tabel 2) menunjukkan bahwa perlakuan level air tebu memberikan pengaruh yang nyata ( $P<0.05$ ) terhadap motilitas total, progresif dan *reverse* pada spermatozoa ayam hutan merah setelah disimpan 24 jam (Tabel 2). Penambahan air

tebu 10-20% mampu mempertahankan motilitas spermatozoa lebih baik dibandingkan kontrol (pengencer ringer laktat-kuning telur 100%). Hal ini ditandai dengan peningkatan motilitas total dan peningkatan motilitas maju (progresif) dan penurunan motilitas yang bergerak mundur (*reverse*).

Berdasarkan hasil ini terlihat bahwa air tebu 20% layak dijadikan pengencer semen ayam karena menghasilkan motilitas progresif yang paling tinggi dan motilitas *reverse* yang paling rendah. Pergerakan maju (progresif) merupakan pergerakan yang normal sedangkan pergerakan mundur (*reverse*) menunjukkan ketidak normalan pada spermatozoa tersebut. Pada umumnya spermatozoa yang bagian tengah/ekor membengkok menunjukkan pola pergerakan yang cenderung mundur.

Penggunaan air tebu 30% dan 40% menurunkan motilitas spermatozoa. Penyimpanan di atas 24 jam untuk perlakuan substitusi air tebu 10-20% kemungkinan masih bisa dilakukan karena motilitas yang masih tergolong tinggi di atas 85%.

Air tebu mampu mempertahankan motilitas spermatozoa diduga karena kandungan gula, mineral dan antioksidan yang berpengaruh baik bagi spermatozoa ayam. Air tebu mengandung sukrosa, glukosa, fruktosa, asam laktat, dekstran dan mineral-

Tabel 2. Motilitas spermatozoa ayam hutan merah setelah penyimpanan 24 jam dengan perlakuan level air tebu dalam pengencer

Perlakuan	Progresif (%)	Reverse (%)	Vibrator (%)	Total (%)
Kontrol	21.46±3.82 <sup>a</sup>	45.53±4.80 <sup>a</sup>	5.88±1.13	72.81±5.52 <sup>b</sup>
Air tebu 10%	46.92±9.06 <sup>c</sup>	36.29±5.43 <sup>b</sup>	5.57±1.89	88.79±4.39 <sup>c</sup>
Air tebu 20%	77.67±6.53 <sup>e</sup>	5.38±1.75 <sup>c</sup>	3.14±1.23	86.24±6.76 <sup>c</sup>
Air tebu 30%	57.57±8.16 <sup>d</sup>	3.64±0.70 <sup>cd</sup>	4.09±1.77	65.32±6.77 <sup>b</sup>
Air tebu 40%	35.12±5.28 <sup>b</sup>	0.51±0.12 <sup>d</sup>	4.01±1.05	39.33±6.04 <sup>a</sup>

mineral (Borges *et al.*, 2012). Sejumlah besar Kalium, klorin, sulfur, magnesium, kalsium, pospor, sebagian kecil silicon, natrium, aluminium, zat besi. 75,5% sukrosa, 3,27% sukrosa, 3% fruktosa (Thai dan Doherty, 2011). Glukosa dan fruktosa merupakan gula yang dapat dimetabolisme oleh spermatozoa untuk menghasilkan Adenosin triposfat (ATP) yang berperan pada pergerakan ekor spermatozoa. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Setiawan *et al.* (2020) bahwa glukosa memainkan peran penting dalam pembentukan ATP untuk pergerakan flagela dan fertilitas spermatozoa ayam melalui glikolisis dan fosforilasi oksidatif.

Selain air tebu juga mengandung zat antioksidan. Menurut Duarte-Almeida *et al.* (2006), ekstrak tebu mengandung berbagai molekul senyawa fenolik seperti flavonoid dan asam sinamat. Daun dan jus tebu memiliki kemampuan yang kuat untuk melindungi terhadap kerusakan DNA yang disebabkan oleh hidroksil radikal yang dihasilkan dalam reaksi Fenton (Abbas *et al.*, 2014) bahwa kemampuan jus tebu untuk mengais radikal bebas, mengurangi kompleks besi dan menghambat peroksidasi lipid (Kadam *et al.*, 2008). Antioksidan berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari serangan radikal bebas penyebab peroksidasi lipid. Spermatozoa ayam sensitive terhadap kerudukan karena mengandung level asam lemak tak jenuh ganda yang cukup tinggi (Bréque *et al.*, 2003), hal ini menyebabkan peroksidasi lipid mudah terbentuk pada spermatozoa ayam (Cerolini *et al.* 2006).

Motilitas vibrator yang diperoleh pada penelitian ini jauh lebih rendah dengan motilitas reverse jauh lebih tinggi dari laporan sebelumnya yaitu masing-masing 25% dan 1.1% pada ayam hutan merah Malaysia (Malik *et al.*, 2013). Sedangkan motilitas progresif juga lebih rendah pada perlakuan kontrol penelitian ini jika dibandingkan penelitian sebelumnya yakni 40% pada ayam hutan merah Malaysia (Malik *et al.*, 2013). Perbedaan ini dapat dipahami karena Malik *et al.* (2013) menggunakan semen segar tanpa penyimpanan.

Motilitas progresif yang diperoleh dengan perlakuan air tebu 20% pada penelitian ini 77.67%, lebih tinggi dari penelitian sebelumnya pada spermatozoa ayam cemani dengan waktu penyimpanan yang sama menggunakan pengencer susu skim fosfat yaitu 62.25% (Budi *et al.*, 2020).

Motilitas total yang diperoleh setelah penyimpanan 24 jam pada perlakuan air tebu 10-20% pada penelitian ini 86.24-88.79%, lebih tinggi dari penelitian sebelumnya pada spermatozoa ayam kampung dengan waktu penyimpanan yang sama yaitu 49.96% menggunakan pengencer ringer laktat kuning telur-astaxanthin (Pratiwi *et al.*, 2019). Perbedaan ini mungkin disebabkan kandungan antioksidan dan gula dalam air tebu yang lebih menguntungkan bagi spermatozoa ayam dibandingkan pengencer susu skim fosfat dan ringer laktat kuning telur. Namun perbedaan teknis penelitian, jenis ayam, dan lingkungan penelitian juga dapat menjadi faktor yang menyebabkan perbedaan ini.

## KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah air tebu 20% dapat ditambahkan dalam pengencer ringer laktat kuning telur untuk mempertahankan motilitas total dan motilitas progresif spermatozoa ayam hutan merah selama penyimpanan 24 jam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S.R., Sabir, S.M., Ahmad, S.D., Boligon, A.A., & Athayde, M.L. (2014). Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). Food Chem. 147, 10-16.
- Bardan, Feradis, & Adelina, T. (2009). Penggunaan air tebu yang dikombinasikan dengan kuning telur sebagai pengencer semen sapi bali. Jurnal Peternakan. 6(2), 36- 43.
- Bréque, C., Surai, P., & Brillard, J.P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Mol. Reprod. Dev. 66,314–323.
- BirdLife International. (2021). Species factsheet: *Gallus gallus*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 07/07/2021.
- Borges, E.P., Lopes, M.L., & Amorim, H. (2012). Impact of sugar cane juice chemical composition on clarification and VHP sugar quality. International Sugar Journal. 144, 552-558.
- Budi, J.A., Bebas, W., & Laksmi, D.N.D.I. (2020). Daya simpan semen ayam cemani dalam pengencer susu skim fosfat pada suhu 4 °C berdasarkan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Indonesia Medicus Veterinus. 9(5), 705-715.
- Casu, R.E., Grof, C.P.L., Rae, A.L., McLntyre, C.L., Dimmock, C.M. & Manners, J.M. (2003). Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and micro array analysis. Plant Mol. Biol. 10,1-16.
- Cerolini, S., Zainiboni, L., Maldjian, A. & Gliozi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and  $\alpha$ -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. Theriogenology. 66, 877-886.
- dos Santos, M.N., Ramachandran, R., Kiess, A.S., Wamsley, K.G.S. & McDaniel, C.D. (2018). The impact of dietary yeast fermentation product derived from *Saccharomyces cerevisiae* on semen quality and semen microbiota of aged white leghorn roosters. J. Appl. Poult. Res. 27, 488–498.
- Du, X., Qin, F., Amevor, F.K., Zhu, Q., Shu, G., Li, D., Tian, Y., Wang, Y. & Zhao, X. (2021). Rearing system influences the testicular development, semen quality and spermatogenic cell apoptosis of layer roosters. Poult. Sci. 100, 101158.
- Duarte-Almedia, J.M., Novoa, A.V., Linares, A.F., Lajolo, F.M., & Genovese, M.I. (2006). Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. Plant. Foods Hum. Nutr. 61(4), 187-192.
- Feradis. (2010). Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Bandung : Alfabeta.

- Getachew, T. (2016). A review article of artificial insemination in poultry. *World Vet. J.* 6(1), 25-33.
- Hambu, E.K., Arifiantini, R.I., Purwantara, B. & Darwati, S. (2016). Raw semen characteristics of three different Indonesian local roosters. *Animal Production.* 18(3), 165-172.
- Hu, J., Chen, J.L., Wen, J., Zhao, G.P., Zheng, M.Q., Liu, R.R., Liu, W.P., Zhao, L.H., Liu, G.F. & Wang, Z.W. (2013). Estimation of the genetic parameters of semen quality in Beijing-You chickens. *Poult. Sci.* 92, 2606-2612.
- Iswati, Isnaini, N. & Susilawati, T. (2017). Fertilitas spermatozoa ayam buras dengan penambahan antioksidan glutathione dalam pengencer ringer's selama simpan dingin. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan.* 27 (1), 107 – 115.
- Kadam, U.S., Ghosh, S.B., Strayo De, Suprasanna, P., Devasagayam, T.P.A. & Bapat, V.A. (2008). Antioxidant activity in sugarcane juice and its protective role against radiation induced DNA damage. *Food Chem.* 106, 1154-1160.
- Khaeruddin, Arismunandar, & Nurda. (2020)a. Karakteristik semen ayam kampung yang diberi minyak hati ikan kod sebagai feed supplement. *Musamus Journal of Livestock Science.* 3(1), 15-24.
- Khaeruddin, Junaedi & Hastuti. (2020)b. Cryopreservation of Indonesian native chicken semen by using dimethyl sulfoxide and various level of ethylene glycol as cryoprotectants. *Biodiversitas.* 21(12), 5718-5722.
- Khaeruddin & Kurniawan, M.E. (2020). Keberhasilan pembekuan semen ayam yang diencerkan dan diperkaya dengan glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa. *Jurnal Veteriner.* 21(3), 476-484.
- Khaeruddin & Srimaharani. (2019). Use of old coconut water with various skim concentrations of milk as a diluent for kampung chicken semen. *Chalaza Journal of Animal Husbandry.* 4 (1), 6-12.
- Magfira, Arifiantini, R.I., Karja, N.K. & Darwati, S. (2017). Efektivitas low density lipoprotein dan kuning telur ayam dan puyuh pada pengawetan semen ayam merawang. *J. Veteriner.* 18(3), 345-352.
- Malik, A., Haron, A.W., Yusoff, R., Nesa, M., Bukar, M. & Kasim, A. (2013). Evaluation of the ejaculate quality of the red jungle fowl, domestic chicken, and bantam chicken in Malaysia. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 37, 564-568.
- Malik, A., Shahdan, M., Zakir, M.I., Sasongko, N. & Sakiman. (2018). Penambahan minyak ikan dalam pengencer skim milk-egg yolk terhadap motilitas dan abnormalitas ayam kampung pasca thawing. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan.* 21(2), 55-69.
- Mphaphathi, M.L., Seshoka, M.M., Luseba, D., Sutherland, B. & Nedambale, T.L. (2016). The characterization and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pasific Journal of Reproduction.* 5(2), 132-139.
- Octa, A. D., Trilaksana I.G.N.B., & Bebas, W. (2014). Glukosa-astaxanthin meningkatkan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada suhu 3-5 °C. *Indonesia Medicus Veterinus.* 3(1), 9-19.

- Pratiwi, N., Yusuf, T. L., Arifiantini, I., & Sumantri, C. (2019). Kualitas spermatozoa dalam modifikasi pengencer ringer laktat kuning telur dengan tambahan astaxanthin dan glutathione pada tiga jenis ayam lokal. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 7(1), 46-54.
- Rakha, B.A., Ansari, M.S., Akhter, S. & Blesbois, E. (2017). Effect of season and age on Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen characteristics: A 4-year retrospective study. *Theriogenology*. 99, 105-110.
- Rakha, B.A., Hussain, I., Malik, M.F., Akhter, S. & Ansari, M.S. (2015). Impact of Ejaculate Frequencies on the Quality of Red Jungle Fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Avian Biology Research*. 8(2), 109-112.
- Rochmi, S.E. & Sofyan, M.S. (2019). A diluent containing coconut water, fructose, and chicken egg yolk increases rooster sperm quality at 5 °C. *Vet. World*. 12(7), 1116-1120.
- Setianto, J., Sutriyono, Prakoso, H. & Zain, B. (2016). Identifikasi asal-usul ayam hutan merah yang dipelihara di Kabupaten Seluma. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 11(2), 141-152.
- Setiawan, R., Priyadarshana, C., Tajima, A., Travis, A.J., & Asano, A. (2020). Localisation and function of glucose transporter GLUT1 in chicken (*Gallus gallus domesticus*) spermatozoa: relationship between ATP production pathways and flagellar motility. *Reproduction, Fertility and Development*. 32(7), 697-705.
- Sopiyana, S., Iskandar, S., Susanti, T. & Yogaswara, D. (2006). Pengaruh Krioprotektan DMA, DMF dan Glycerol pada Proses Pembekuan Semen Ayam Kampung. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner: Cakrawala baru IPTEK Menunjang Revitalisasi Peternakan. Bogor, 5-6 September 2006, Fakultas MIPA, Universitas Pakuan.
- 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, 14-19.
- Tantu, Y.R. (2007). Fenotype dan Genotipe Ayam Hutan Merah (*Gallus gallus gallus*) dan Ayam Kampung (*Gallus gallus domesticus*) di Watutela dan Ngatabaru Sulawesi Tengah. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Tesfay, H.H., Sun, Y., Li, Y., Shi, L., Fan, J., Wang, P., Zhong, Y., Ni, A., Ma, H., Mani, A.I. & Chen, J. (2020). Comparative studies of semen quality traits and sperm kinematic parameters in relation to fertility rate between 2 genetic groups of breed lines. *Poult. Sci.* 99, 6139-6146.
- Thai, C.C.D. & Doherty, W.O.S. (2011). The composition of sugarcane juices derived from burnt cane and whole green cane crop. In Bruce, Robin (Ed.) 33rd Annual Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists 2011, Curran Associates, Inc., Mackay, Qld., p.368.