

Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Ayam Kampung yang Disimpan dengan Penurunan Suhu yang Berbeda

Motility and Plasma Membrane Integrity of Kampung Chicken Spermatozoa Stored with Different Decreasing of Temperature

Khaeruddin

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai.
Jl. Teuku Umar No. 8, Biringere, Sinjai Utara 92611, Sulawesi Selatan, Indonesia
Email: erukhaeruddin@gmail.com

ABSTRAK

Penyimpanan semen pada suhu 5°C berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan variabel motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa ayam Kampung yang disimpan langsung pada suhu 5 °C dengan penyimpanan dengan penurunan suhu yang bertahap setelah proses koleksi semen. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 taraf perlakuan dan 9 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan yaitu penyimpanan pada suhu tetap 5 °C selama 75 menit (P1), penyimpanan pada suhu yang diturunkan bertahap dari 41 °C 30 menit - 21 °C 30 menit - 5 °C 15 menit (P2), dan penyimpanan pada suhu yang diturunkan bertahap dari suhu 41 °C 15 menit - 31 °C 15 menit - 21 °C 15 menit - 11 °C 15 menit - 5 °C 15 menit (P3). Data hasil penelitian yang berdistribusi normal dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan penurunan suhu yang berbeda tidak mempengaruhi ($P>0.05$) variabel motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan. Rataan motilitas total, motilitas progresif dan keutuhan membran plasma yang didapatkan masing-masing 25.36-41.22%, 67.30-77.08% dan 92.35-96.29%. Kesimpulan penelitian ini adalah spermatozoa ayam Kampung yang dikoleksi dapat langsung disimpan pada suhu 5 °C tanpa adanya perlakuan penurunan suhu yang bertahap karena tidak ditemukan perbedaan variabel motilitas keutuhan membran plasma pada perlakuan tersebut.

Kata kunci: Ayam Kampung, Keutuhan Membran Plasma, Motilitas, Spermatozoa, Suhu

ABSTRACT

Semen storage at a temperature of 5°C affects the quality of spermatozoa. The purpose of this study was to determine the differences in motility and plasma membrane integrity of Kampung chicken spermatozoa variables that were stored directly at 5 °C with storage with a gradual decrease in temperature after the semen collection process. This study used a completely randomized design with 3 treatment levels and 9 replications. The treatment used was storage at a fixed temperature of 5 °C for 75 minutes (P1), storage at a gradually lowered temperature from 41 °C 30 minutes - 21 °C 30 minutes - 5 °C 15 minutes (P2), and storage at a gradually lowered temperature from temperature 41°C 15 minutes - 31 °C 15 minutes - 21 °C 15 minutes - 11 °C 15 minutes - 5 °C 15 minutes (P3). Research data that were normally distributed were analyzed using analysis of variance (ANOVA). The results showed that different temperature reduction treatments did not affect ($P>0.05$) the motility and plasma membrane integrity of spermatozoa variables during storage. The mean total motility, progressive motility and plasma membrane integrity were 25.36-41.22%, 67.30-77.08% and 92.35-96.29%, respectively. The conclusion of this study was that collected Kampung chicken spermatozoa could be directly stored at 5°C without any gradual reduction in temperature because no differences in plasma membrane integrity motility variables were found in the treatment.

Keywords: Kampung Chicken, Motility, Plasma Membrane Integrity, Spermatozoa, Temperature

PENDAHULUAN

Ayam Kampung merupakan ayam asli Indonesia yang cukup adaptif terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim jika dibandingkan ayam ras impor. Selain itu, masyarakat Indonesia cenderung lebih suka mengonsumsi daging ayam Kampung dibandingkan ayam ras impor. Kondisi ini menekankan pentingnya upaya peningkatan populasi dan perbaikan mutu genetik ayam Kampung. Perkembangan teknologi di bidang peternakan untuk peningkatan populasi maupun perbaikan mutu genetik ternak semakin gencar dilakukan. Inseminasi buatan (IB) pada unggas adalah salah satu teknologi reproduksi dengan memanfaatkan semen dari pejantan unggul untuk diinseminasikan ke ayam betina produktif dengan tujuan meningkatkan mutu genetik keturunan, mengoptimalkan pejantan unggul dan memperbanyak *day old chick* dengan umur yang seragam. Namun, keberhasilan inseminasi bergantung pada kualitas spermatozoa yang diinseminasikan.

Spermatozoa adalah sel yang sangat sensitif terhadap perubahan suhu lingkungan. Menurut Andhare dan Poojary (2015) suhu penyimpanan mempengaruhi fluiditas membran dan mempengaruhi daya fertil spermatozoa. Spermatozoa dihasilkan dari testis ayam yang berada di dalam tubuhnya. Testis ayam berfungsi normal pada suhu 41 °C mendekati suhu tubuh ayam (Suyadi dan Wahjuningsih, 2021). Pada saat koleksi semen, spermatozoa keluar dan berada pada kondisi lingkungan dengan suhu lebih rendah dari suhu tubuh ayam tersebut. Untuk memperpanjang daya hidup spermatozoa pasca penampungan maka diperlukan penyimpanan pada suhu rendah (5 °C). Menurut Gibb dan Aitken (2016) pendinginan spermatozoa pada suhu antara 4-10 °C bertujuan untuk membatasi laju metabolisme. Penghambatan laju metabolisme tersebut bisa memperpanjang daya hidup spermatozoa. Namun, penyimpanan spermatozoa langsung dari suhu tinggi ke suhu rendah dapat menyebabkan perubahan fisiologis pada spermatozoa itu sendiri. Menurut Clarke *dkk.* (1982) penurunan suhu inkubasi spermatozoa ayam dari 41 °C hingga 5 °C menurunkan konsumsi oksigen spermatozoa tersebut. Sedangkan Chanavat *dkk.* (2005) melaporkan bahwa peroksidasi lipid, influks kalsium, fosfolipid *disorder* lebih banyak terjadi pada spermatozoa yang disimpan pada suhu 4 °C jika dibandingkan 15 °C.

Membran plasma spermatozoa adalah struktur yang berfungsi penting melindungi spermatozoa terhadap cedera ekstraseluler dan berperan penting dalam interaksi spermatozoa dengan sel telur pada proses fertilisasi (Tapia *dkk.*, 2012). Untuk mencapai dan menembus sel telur, spermatozoa harus memiliki motilitas progresif (Dcunha *dkk.*, 2020). Namun, paparan suhu yang tinggi dapat menurunkan motilitas progresif pada spermatozoa (Gong *dkk.*, 2017). Pendinginan semen hingga 5 °C diketahui mampu meningkatkan permeabilitas membran plasma spermatozoa (Gaczarzewicz *dkk.*, 2015). Penelitian-penelitian lainnya menunjukkan bahwa suhu penyimpanan berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa. Kerusakan membran sel jauh lebih rendah ketika spermatozoa disimpan pada suhu 20 °C jika dibandingkan ketika disimpan pada suhu 37°C dan 25 °C (Andhare dan Poojary, 2015). Pendinginan spermatozoa dari 25 hingga 5 °C dan pemanasan berikutnya hingga 40 °C menyebabkan perubahan fluiditas membran sel (Canvin dan Buhr, 1989). Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan variabel motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa ayam Kampung yang disimpan langsung pada suhu 5 °C dengan penyimpanan dengan penurunan suhu yang bertahap setelah proses koleksi semen.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 taraf perlakuan dan 9 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan yaitu:

P1 = penyimpanan pada suhu tetap 5 °C selama 75 menit.

P2 = penyimpanan pada suhu yang diturunkan bertahap dari 41 °C 30 menit - 21 °C 30 menit - 5 °C 15 menit.

P3 = penyimpanan pada suhu yang diturunkan bertahap dari suhu 41°C 15 menit - 31 °C 15 menit - 21 °C 15 menit - 11 °C 15 menit - 5 °C 15 menit.

Prosedur penelitian

Persiapan Pejantan

Semen yang digunakan berasal dari semen ayam Kampung jantan berumur lebih dari satu tahun yang dipelihara menggunakan kandang individu berukuran 40 x 50 x 70 cm (Khaeruddin dan Kurniawan, 2020; Khaeruddin dan Srimaharani, 2019).

Koleksi Semen dan Penyimpanan Semen

Semen ditampung dengan menggunakan teknik *abdominal massage* (Burrows dan Quinn, 1937). Bagian perut di sekitar kloaka dipijat hingga ayam terangsang yang ditandai dengan terangkatnya ekor, pemerahan dilakukan segera setelah bagian papilla keluar pada kloaka hingga semen keluar. Tabung kecil digunakan dalam menampung semen kemudian di bawa ke laboratorium. Semen ayam ditampung sekali dalam dua hari. Semen segar dibagi dalam tiga *microtube* dan disimpan 75 menit dengan suhu sesuai perlakuan.

Parameter Penelitian

Motilitas Spermatozoa

Larutan infus (KA-EN 3B®, Otsuka) 10 µL diletakkan pada kaca preparat dicampur dengan semen 0.2 µL kemudian dihomogenkan. Preparat ditutup dengan kaca penutup dan diamati pada mikroskop cahaya perbesaran 40 x. Penampakan objek direkam dengan kamera kemudian video diinput ke komputer. Penilaian motilitas dilakukan secara objektif dengan menghitung spermatozoa yang bergerak progresif, non progresif, immotil dan motilitas total pada 200 sel spermatozoa. Rumus perhitungan motilitas sebagai berikut:

$$\text{Motilitas total (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa motil}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100$$

$$\text{Motilitas progresif (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa motil progresif}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100$$

$$\text{Motilitas non progresif (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa motil non progresif}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100$$

$$\text{Immotil (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa immotil}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100$$

Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa

Pengamatan keutuhan membran plasma spermatozoa menggunakan teknik *hypoosmotic swelling test* berdasarkan Mehdipour *dkk.* (2016) dan Najafi *dkk.* (2021) dengan sedikit modifikasi oleh peneliti. Larutan hipoosmotik dibuat dengan komposisi 0.9 g fruktosa dan 0.49 g sodium sitrat dilarutkan dalam 100 µL air destilasi. Semen segar 5 µL dicampur dengan 100 µL larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setetes semen diletakkan pada kaca preparat yang telah dihangatkan dan ditutup dengan gelas penutup. 200 sel spermatozoa diamati pada mikroskop Cahaya perbesaran 40x. Identifikasi spermatozoa dengan membran plasma utuh berdasarkan Santiago-Moreno *dkk.* (2009) yaitu ekor membengkok, ujung ekor melipat, bagian tengah membengkok, ekor memendek dan menebal.

Analisis Data

Data hasil penelitian diuji normalitasnya menggunakan uji Shapiro Wilk. Data yang berdistribusi normal dilanjutkan dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) jika ditemukan pengaruh perlakuan yang nyata maka dilakukan uji Jarak Berganda Duncan. Analisis data menggunakan *software* SPSS 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa dapat dinilai berupa gerakan progresif (arah depan) dan non progresif (gerakan acak atau osilasi) (Suyadi dan Wahjuningsih, 2021). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan penyimpanan selama 75 menit dengan tahapan penurunan suhu yang berbeda tidak berpengaruh ($P > 0.05$) terhadap persentase motilitas total, progresif, non progresif dan persentase spermatozoa immotil (Tabel 1). Tidak adanya perbedaan motilitas ini mungkin disebabkan karena waktu penyimpanan yang relatif singkat, perbedaan motilitas kemungkinan akan terjadi jika semen disimpan pada waktu yang lebih lama dari penelitian ini. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Blank *dkk.*, (2021) yang menyatakan tidak adanya perbedaan motilitas total dan motilitas progresif pada spermatozoa ayam yang disimpan 2-4 jam pada suhu 25 °C dengan 5 °C.

Tabel 1. Hasil pengamatan motilitas spermatozoa ayam Kampung setelah penyimpanan 75 menit dengan perlakuan penurunan suhu yang berbeda

Perlakuan	Progresif (%)	Non progresif (%)	Immotil (%)	Motilitas total (%)
P1	25.36±6.99	42.25±5.58	32.70±4.55	67.30±4.55
P2	27.02±5.32	43.65±5.37	29.32±5.37	70.68±4.21
P3	41.22±8.99	35.86±5.86	22.92±5.04	77.08±5.04

Keterangan: P1: 5 °C, P2: 41°C-21°C-5°C, dan P3: 41°C-31°C-21°C-11°C-5°C.

Motilitas total yang diperoleh setelah penyimpanan 75 menit pada penelitian ini yaitu 67-77.08%. Hasil ini hampir sama dengan yang didapatkan oleh Kusuma *dkk.* (2018) dengan menggunakan pengencer kuning telur fosfat ditemukan bahwa motilitas spermatozoa ayam Pelung yang disimpan selama 60 menit pada suhu 29 °C adalah 76.1%.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Vašiček dan Chrenek (2013) bahwa motilitas progresif pada spermatozoa ayam lebih tinggi selama penyimpanan 60 menit pada suhu 8 °C jika dibandingkan dengan penyimpanan 37 °C. Namun, motilitas progresif yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 25.36-41.22% hampir sama dengan yang didapatkan Vašiček dan Chrenek (2013) yaitu 27.10% pada spermatozoa ayam Lohman yang disimpan pada suhu 8 °C selama 60 menit. Namun lebih rendah dari yang didapatkan Clarke *dkk.* (1982) yaitu 80% pada penyimpanan 3 jam dengan suhu 5 °C.

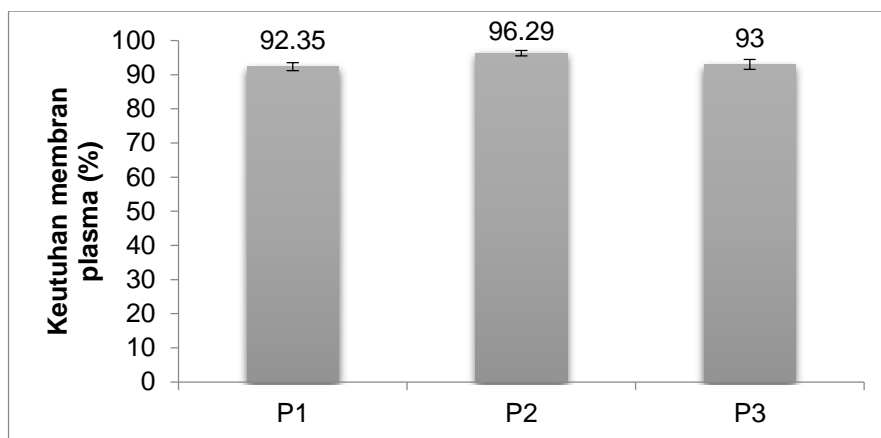
Persentase motilitas non progresif pada penelitian ini pada umumnya lebih tinggi jika dibandingkan persentase motilitas progresif. Sejalan dengan penelitian Davila *dkk.* (2015) bahwa persentase motilitas non progresif (53.01%) lebih tinggi dari motilitas progresif (28.27%) pada spermatozoa ayam Spanyol yang disimpan pada suhu 5 °C selama 45 menit.

Motilitas spermatozoa unggas dipengaruhi oleh banyak faktor, di antaranya suhu penyimpanan. Umumnya spermatozoa memiliki motilitas rendah pada suhu yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dengan kisaran yang ideal adalah 20-37 °C (Sarkar, 2020). Motilitas spermatozoa unggas dapat dipengaruhi oleh jumlah oksigen dan ion kalsium yang ada dalam spermatozoa (Suyadi dan Wahjuningsih, 2021). Namun, penurunan konsumsi oksigen pada spermatozoa ayam dapat terjadi Ketika suhu inkubasi 41 °C diturunkan hingga 5 °C (Clarke *dkk.*, 1982). Menurut Chakraborty dan Saha (2022), motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh pH intraseluler dan ekstraseluler bersama dengan ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion karbonat (konsentrasi

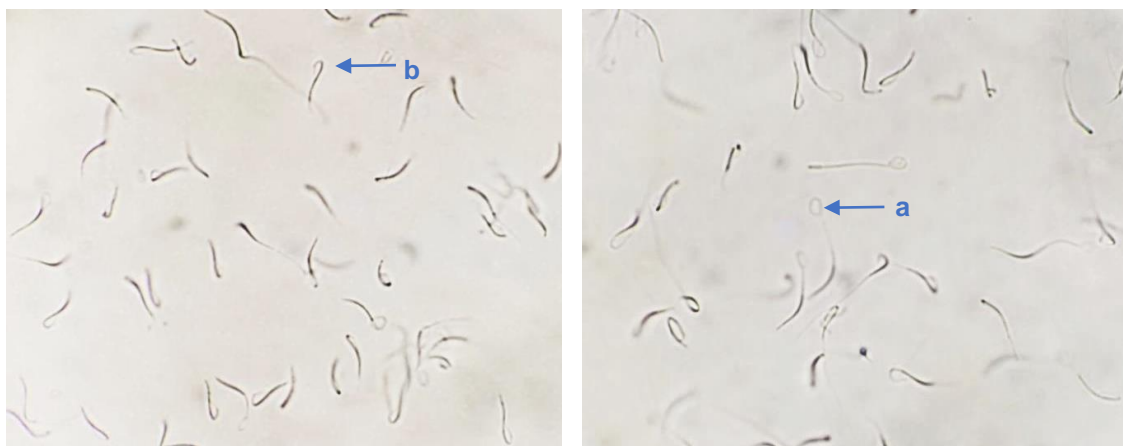
HCO₃⁻). Penurunan suhu menyebabkan peningkatan serapan kalsium oleh spermatozoa dan efeknya lebih besar jika laju pendinginan lebih cepat (White, 1993).

Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan penyimpanan selama 75 menit dengan tahapan penurunan suhu yang berbeda tidak berpengaruh ($P>0.05$) terhadap keutuhan membran plasma spermatozoa ayam Kampung (Gambar 1 & 2). Tidak adanya perbedaan keutuhan membran plasma ini mungkin disebabkan karena waktu penyimpanan yang relatif singkat, perbedaan kemungkinan akan terjadi jika semen disimpan pada waktu yang lebih lama dari penelitian ini. Hasil ini sejalan dengan penelitian Blank *dkk*, (2021) yang menunjukkan tidak ada perbedaan keutuhan membran plasma spermatozoa ayam yang disimpan pada suhu 5 °C dan 25 °C.



Gambar 1. Keutuhan membran plasma spermatozoa ayam Kampung setelah penyimpanan 75 menit dengan perlakuan penurunan suhu yang berbeda.



Gambar 2. Hasil pengamatan keutuhan membran spermatozoa ayam Kampung (perbesaran 40x) dengan teknik *hypoosmotic swelling test* (HOST). Spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor membengkok (a) atau bagian tengah membengkok (b).

Spermatozoa yang membengkok dalam larutan HOST menunjukkan spermatozoa dengan membran plasma spermatozoa utuh (Gambar 2). Semen yang normal memiliki minimal 60% spermatozoa dengan membran plasma utuh spermatozoa sedangkan jika semen yang abnormal jika spermatozoa dengan membran plasma utuh hanya 40% (Zubair *dkk*, 2015). Sehingga spermatozoa pada penelitian ini tergolong sangat baik karena keutuhan membrane di atas 90%.

Abbaspour *dkk.* (2020) melaporkan pada semen segar ayam broiler diperoleh keutuhan membran plasma spermatozoa berkisar 70.47-90.27%. Sedangkan keutuhan membran plasma 89.2-91.5% didapatkan ketika spermatozoa ayam disimpan pada suhu 5 °C selama 0 jam menggunakan pengencer (Masoudi *dkk.* 2020).

Membran plasma spermatozoa adalah struktur yang sangat penting yang berfungsi dalam proses fertilisasi (Tapia *dkk.*, 2012). Namun, sejumlah faktor dapat merusak membran plasma spermatozoa selama pemrosesan semen seperti pengencer semen yang tidak sesuai, sentrifugasi, pendinginan dan penyimpanan pada suhu 4-6 °C (Aurich, 2005). Membran sel spermatozoa terdiri dari gabungan kompleks lipid termasuk fosfolipid, glikolipid dan sterol (Gautier dan Aurich, 2022). Membran sel spermatozoa ayam mengandung asam lemak tak jenuh ganda yang tinggi sehingga mudah mengalami peroksidasi lipid (Mussa *dkk.*, 2021). Peroksidasi lipid dapat menyebabkan hilangnya fluiditas dan keutuhan membran sel spermatozoa (Colagar *dkk.*, 2013).

KESIMPULAN

Spermatozoa ayam Kampung yang dikoleksi dapat langsung disimpan pada suhu 5 °C tanpa adanya perlakuan penurunan suhu yang bertahap karena tidak ditemukan perbedaan variabel motilitas dan keutuhan membran plasma pada perlakuan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbaspour, B., Sharifi, S. D., Ghazanfari, S., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., & Honarbakhsh, S. (2020). Effect of dietary supplementation of whole flaxseed on sperm traits and sperm fatty acid profile in aged broiler breeder roosters. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(5), 594-603.
- Andhare, V.V., & Poojary, B. (2015). Effect of temperature on membrane integrity of human spermatozoa. *Research Journal of Recent Sciences*, 4(ISC-2014), 152-154.
- Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 65-75.
- Blank, M. H., Ruivo, L. P., Novaes, G. A., Lemos, E. C., Losano, J. D., Siqueira, A. F., & Pereira, R. J. (2021). Assessing different liquid-storage temperatures for rooster spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 233, 106845.
- Burrows, W. H., & Quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16(1), 19-24.
- Canvin, A. T., & Buhr, M. M. (1989). Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *Reproduction*, 85(2), 533-540.
- Chakraborty, S., & Saha, S. (2022). Understanding sperm motility mechanisms and the implication of sperm surface molecules in promoting motility. *Middle East Fertility Society Journal*, 27(1), 1-12.
- Chanavat, E., Vidament, M., Defoin, L., Duchamp, G., Levillain, N., Yvon, J. M., Le Vern, Y., Kerboeuf, D. & Magistrini, M. (2005). Effect of storage and temperature on in vitro stallion sperm parameters and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 89(1), 318.
- Clarke, R. N., Sexton, T. J., & Ottinger, M. A. (1982). Effects of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility, and fertility of chicken and turkey semen. *Poultry Science*, 61(9), 1912-1917.
- Colagar, A. H., Karimi, F., & Jorsaraei, S. G. A. (2013). Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno-and oligoastheno-teratospermic men. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(9), 780.
- Davila, S. G., Campo, J. L., Gil, M. G., Castano, C., & Santiago-Moreno, J. (2015). Effect of the presence of hens on rooster sperm variables. *Poultry Science*, 94(7), 1645-1649.

- Dcunha, R., Hussein, R. S., Ananda, H., Kumari, S., Adiga, S. K., Kannan, N., Zhao, Y., & Kalthur, G. (2020). Current insights and latest updates in sperm motility and associated applications in assisted reproduction. *Reproductive Sciences*, 1-19.
- Gaczarzewicz, D., Udala, J., Piasecka, M., Blaszczyk, B., & Stankiewicz, T. (2015). Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turkish Journal of Biology*, 39(4), 582-594.
- Gautier, C., & Aurich, C. (2022). "Fine feathers make fine birds"–The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 246, 106884.
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). The Impact of Sperm Metabolism During In Vitro Storage: The Stallion as A Model, *BioMed Research International*, 9380609.
- Gong, Y., Guo, H., Zhang, Z., Zhou, H., Zhao, R., & He, B. (2017). Heat stress reduces sperm motility via activation of glycogen synthase kinase-3 α and inhibition of mitochondrial protein import. *Frontiers in physiology*, 8, 718.
- Khaeruddin, K., & 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, K., & Srimaharani, S. (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), 24-29.
- Kusuma, P. W., Bebas, W., & Budiasa, M. K. (2018). Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam Pelung dalam pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 29 °C. *Indonesia Medicus Veterinus*, 7(2), 115-122.
- Masoudi, R., Sharafi, M., Pourazadi, L., Davachi, N. D., Asadzadeh, N., Esmaeilkhanian, S., & Dirandeh, E. (2020). Supplementation of chilling storage medium with glutathione protects rooster sperm quality. *Cryobiology*, 92, 260-262.
- Mehdipour, M., Kia, H. D., Najafi, A., Dodaran, H. V., & García-Álvarez, O. (2016). Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73(3), 297-303.
- Mussa, N. J., Ratchamak, R., Ratsiri, T., Vongpralub, T., Boonkum, W., Semaming, Y., & Chankitisakul, V. (2021). Lipid profile of sperm cells in Thai native and commercial roosters and its impact on cryopreserved semen quality. *Tropical Animal Health and Production*, 53, 1-9.
- Najafi, A., Taheri, R. A., Mehdipour, M., Martínez-Pastor, F., Rouhollahi, A. A., & Nourani, M. R. (2019). Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. *Poultry science*, 98(1), 440-446.
- Sarkar, P. K. (2020). Motility, viability and fertilizing ability of avian sperm stored under in vitro conditions. *Reviews in Agricultural Science*, 8, 15-27.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Coloma, M. A., Gómez-Brunet, A., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., & Campo, J. L. (2009). Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. *Poultry Science*, 88(12), 2661-2669.
- Suyadi, S. & Wahjuningsih, S. (2021). *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Unggas*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Pena, F. J., & Aparicio, I. M. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in domestic animals*, 47, 65-75.

- Vašíček, J., & Chrenek, P. (2013). Effect of storage temperature on the motility characteristics of rooster spermatozoa. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (special issue 1), 1685-1691.
- White, I. G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 639-658.
- Zubair, M., Ahmad, M., & Jamil, H. (2015). Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test. *Andrologia*, 47(7), 744-750.