

Viabilitas dan Fragmentasi DNA Spermatozoa pada Semen Beku Ayam Kampung Menggunakan Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur yang Ditambahkan Glisin dan Fruktosa

Agi Jefani Efendi^{1*}, Khaeruddin², Bahri Syamsuryadi², Hermawansyah², Junaedi³

¹ Mahasiswa Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai

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

² Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai

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

³ Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian Perikanan dan Peternakan, Universitas Sembilanbelas November Kolaka.

Jl. Pemuda No. 339, Kolaka 93517, Sulawesi Tenggara, Indonesia.

* agi140520@gmail.com

INFORMASI ARTIKEL

Diterima 14 Juni 2026
 Hasil revisi diterima 26 Juni 2026
 Accepted 27 Juni 2026
 Diterbitkan 27 Juni 2026

Kata-kata kunci:
 Fragmentasi spermatozoa; DNA
 Fruktosa;
 Glisin;
 Kriopreservasi semen ayam;
 Viabilitas;

DOI: 10.47030/trolija.v6i1.1145

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan glisin dan fruktosa pada ringer laktat kuning telur terhadap viabilitas dan fragmentasi DNA spermatozoa beku ayam kampung. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan: P0 (ringer laktat + kuning telur), P1 (ringer laktat + kuning telur + glisin 60 mM), P2 (ringer laktat + kuning telur + fruktosa 80 mM), dan P3 (ringer laktat + kuning telur + glisin 60 mM + fruktosa 80 mM), masing-masing dengan 6 ulangan. Semen diekuilibrasikan 2 jam pada suhu 5 °C, prefreezing dengan ketinggian 3 cm pada uap nitrogen selama 10 menit, penyimpanan 24 jam dan thawing pada suhu 37 °C selama 30 detik. Evaluasi dilakukan terhadap viabilitas spermatozoa menggunakan pewarnaan eosin nigrosin serta integritas DNA dengan pewarnaan toluidine blue. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh ($P < 0,05$) terhadap viabilitas *post thawing* namun tidak berpengaruh ($P > 0,05$) terhadap fragmentasi DNA *post thawing*. Penambahan glisin mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa selama pembekuan, sedangkan penambahan fruktosa tidak memberikan pengaruh. Viabilitas spermatozoa *post thawing* dapat dipertahankan hingga 46,57-77,12%, sedangkan kerusakan DNA yang terjadi setelah pembekuan mengalami peningkatan sebesar 6,51-9,61%. Penggunaan glisin 60 mM memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa ayam kampung selama pembekuan.

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 14 June 2026
 Received in revised form 26 June 2026
 Accepted 27 June 2026
 Available online 27 June 2026

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of adding glycine and fructose to egg yolk lactate ringer on the viability and DNA fragmentation of frozen native chicken spermatozoa. This study used a completely randomized design with 4 treatments: P0 (Ringer's lactate + egg yolk), P1 (Ringer's lactate + egg yolk + 60 mM glycine), P2 (Ringer's lactate + egg yolk + 80 mM fructose), and P3 (Ringer's lactate + egg yolk + 60 mM glycine + 80 mM fructose), each with 6 replications. Semen was

Key words:

Chicken semen
cryopreservation;
Fructose;
Glycine;
Sperm DNA fragmentation;
Viability;

DOI: 10.47030/trolj.v6i1.1145

equilibrated for 2 hours at 5 °C, prefreezing at a height of 3 cm in nitrogen vapor for 10 minutes, storage for 24 hours and thawing at 37 °C for 30 seconds. Evaluation was carried out on spermatozoa viability using eosin nigrosin staining and DNA integrity with toluidine blue staining. The results showed that the treatment had an effect ($P < 0.05$) on post-thawing viability but had no effect ($P > 0.05$) on post-thawing DNA fragmentation. The addition of glycine was able to maintain spermatozoa viability during freezing, while the addition of fructose had no effect. Post-thawing spermatozoa viability could be maintained up to 46.57-77.12%, while DNA damage that occurred after freezing increased by 6.51-9.61%. The use of 60 mM glycine gave the best results in maintaining the viability of native chicken spermatozoa during freezing.

PENDAHULUAN

Ayam kampung (*Gallus domesticus*) sebagai plasma nutfah lokal Indonesia memiliki potensi genetik unggul seperti adaptasi lingkungan tinggi dan resistensi penyakit, namun terancam erosi genetik akibat persilangan yang tidak terkontrol serta hilangnya populasi akibat pemeliharaan ekstensif. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan pemanfaatan teknologi kriopreservasi semen.

Kriopreservasi semen ayam kampung adalah teknologi pengawetan semen ayam dengan cara pembekuan pada suhu -196 °C, namun hal ini dapat menyebabkan perubahan bentuk dan fungsi membran spermatozoa selama proses pembekuan-pencairan yang mengakibatkan penurunan viabilitas (Zong *et al.*, 2023) dan kerusakan DNA sel spermatozoa sehingga kualitas semen beku rendah setelah *thawing* (Di Santo *et al.*, 2012). DNA spermatozoa yang rusak dapat menyebabkan ekspresi gen yang cacat, proses pembelahan yang terganggu, dan pembentukan epigenetik yang buruk pada embrio tahap awal (Abou El-Ela *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023; Ni *et al.*, 2014).

Spermatozoa ayam lebih rentan terhadap kerusakan pembekuan karena bentuk filiform dengan volume sitoplasma rendah yang membatasi penyerapan krioprotektan (Blesbois, 2012; Long, 2014), selain itu membran plasma juga kaya asam lemak tak

jenuh ganda yang mudah mengalami peroksidasi lipid (Mussa *et al.*, 2021).

Pengencer semen diperlukan untuk melindungi spermatozoa dari faktor-faktor berbahaya pada proses pembekuan seperti stres osmotik, stres oksidatif, dan cedera sel oleh kristal es. Pengencer semen menjaga sperma dengan menstabilkan sifat-sifatnya, termasuk morfologi spermatozoa, motilitas, dan viabilitas serta integritas membran, akrosom, dan integritas DNA (Bustani & Baiee, 2021). Di Indonesia, peneliti umumnya memanfaatkan pengencer sederhana seperti larutan infus seperti Ringer laktat (Wijaya *et al.*, 2026), yang sering digabungkan dengan bahan hewani seperti kuning telur (Widyasanti *et al.*, 2025). Kuning telur dimanfaatkan karena kemampuannya melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*) (Moussa *et al.*, 2002). Penambahan 10% kuning telur ke pengencer ringer laktat yang efektif mempertahankan motilitas spermatozoa ayam selama pembekuan (Khairuddin, *et al.*, 2019).

Kerusakan pada sel spermatozoa dapat dicegah melalui pemanfaatan asam amino dalam pengencer, mengingat senyawa ini bertindak sebagai antioksidan (Sangeeta *et al.*, 2015; Davoodian *et al.*, 2017). Kemampuan protektif tersebut didukung oleh bukti bahwa asam amino dapat menekan pembentukan spesies oksigen reaktif di dalam sel (Koohestanidehaghi *et al.*, 2021). Glisin adalah salah satu asam amino yang telah dikaji sebagai bahan tambahan pengencer semen

ayam. Motilitas progresif spermatozoa ayam kampung unggul balitbangtan (KUB) dilaporkan lebih tinggi setelah *thawing* dengan penambahan glisin (Junaedi *et al.*, 2024b). Glisin juga mampu mempertahankan viabilitas sperma kampung pada suhu 5 °C selama 3 hari penyimpanan (Salam *et al.*, 2025), bahkan hingga 5 hari penyimpanan (Junaedi *et al.*, 2024a). Walaupun demikian, laporan lain menunjukkan tidak adanya pengaruh signifikan glisin terhadap viabilitas dan fragmentasi DNA spermatozoa ayam selama penyimpanan di 5 °C selama 3 hari (Khaeruddin *et al.*, 2026).

Selain itu, spermatozoa memerlukan energi untuk mempertahankan integritas dan pergerakannya (Abruzzese *et al.*, 2024). Fruktosa merupakan sumber energi utama untuk metabolisme dan motilitas spermatozoa (Echeverría *et al.*, 2024). Namun, fruktosa dilaporkan tidak ada atau sangat rendah dalam semen ayam (Lake, 1957), sehingga diperlukan penambahan dari luar. Penambahan fruktosa dalam pengencer mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5 °C (Khaeruddin, *et al.*, 2024), dan pembekuan (Magfira, *et al.*, 2023). Kombinasi glisin dan fruktosa dalam pengencer semen ayam belum pernah diteliti, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan glisin dan fruktosa pada ringer laktat kuning telur terhadap viabilitas dan fragmentasi DNA spermatozoa beku ayam kampung.

METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 taraf perlakuan dan 6 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan terdiri dari:

- P0 = Ringer laktat + kuning telur
P1 = Ringer laktat + kuning telur + glisin 60 mM
P2 = ringer laktat + kuning telur + fruktosa 80 mM

- P3 = Ringer laktat + kuning telur + glisin 60 mM + fruktosa 80 mM

Prosedur Penelitian

Pemeliharaan Pejantan

Ayam jantan sebanyak 5 ekor berumur ± 12 bulan dipelihara dalam kandang individu (50 x 50 x 66 cm). Ayam diberi pakan 100 g/ekor/hari dengan kandungan protein kasar protein kasar 20,77% dan energi metabolisme 2861 kkal/kg dan air minum diberikan *adlibitum*.

Koleksi Semen dan Evaluasi Semen Segar

Semen dikoleksi menggunakan teknik pemijatan. Pemijatan dilakukan pada bagian abdominal hingga ayam terangsang ditandai dengan terangkatnya ekor dan *phallus* menonjol. Segera setelah *phallus* menonjol, dilakukan pemerahan hingga keluar semen dan ditampung dengan corong dan microtube (Khaeruddin *et al.*, 2025). Koleksi semen dilakukan dengan frekuensi 3 kali sepekan (Pimprasert *et al.*, 2023). Semen dievaluasi secara makroskopis (volume, warna, pH dan konsistensi semen) dan mikroskopis (konsentrasi, gerak massa, motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa).

Penyiapan Pengencer

Pengencer dasar yang digunakan adalah Ringer laktat 90% dan kuning telur 10%. Pengencer dasar disentrifius 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebagai pengencer dan endapan dibuang. Supernatan tersebut digabungkan dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan penisilin 1000 IU dan streptomisin 1 mg/ml. Pengencer ditambahkan tris untuk menyesuaikan pH pengencer dengan semen kemudian distirer 5 menit (Khaeruddin *et al.*, 2015). Setelah itu, ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 7% (Junaedi *et al.*, 2016; Khaeruddin *et al.*, 2020c). Pengencer selanjutnya dibagi dalam tabung dan diberi perlakuan penambahan glisin 60 mM dan fruktosa 80 mM.

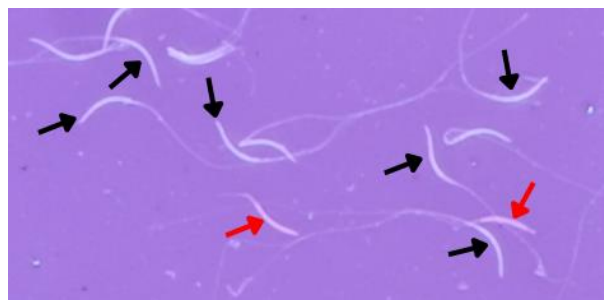
penelitian Darni *et al.* (2021) dengan konsentrasi 1,69-2,06 milyar/ml pada ayam kampung. Konsentrasi spermatozoa sangat penting untuk menentukan dosis inseminasi buatan. Gerak massa spermatozoa pada penelitian ini tergolong sangat baik dengan karakteristik tebal dan cepat berpindah (+++). Motilitas semen segar yang didapatkan berada pada rata-rata 72,8%, sedangkan viabilitas spermatozoa berada pada rata-rata 94,79%. Motilitas sperma digunakan untuk memprediksi kualitas semen dan kemampuan pembuahan pada ayam jantan pejantan (Sun *et al.*, 2019). Studi Khaeruddin *et al.* (2020a) menunjukkan hasil yang lebih tinggi yaitu motilitas 80,33% dan viabilitas 95,34%. Abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini berada pada rata-rata 7,32%. Namun, hampir sama dengan yang dilaporkan oleh Junaedi *et al.* (2016) yaitu pada rata-rata 7,33% dengan abnormalitas primer 1,43% dan abnormalitas sekunder 5,90%.

Viabilitas Spermatozoa Selama Pembekuan

Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa pada penelitian ini terlihat pada Gambar 1. Kepala Spermatozoa yang menyerap eosin nigrosine terlihat berwarna merah menandakan spermatozoa tersebut mati sedangkan spermatozoa yang putih menandakan hidup. Sifat semi permeabel membran plasma yang hilang pada spermatozoa yang mati menyebabkan zat warna tersebut dapat dengan mudah menembus ke dalam spermatozoa (Sharma & Agarwal, 2021).

Hasil penelitian (Tabel 2) menunjukkan viabilitas spermatozoa sebelum pembekuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) antar perlakuan. Viabilitas sebelum pembekuan berada pada kisaran 93,50-94,98%. Hasil lebih rendah dari penelitian Khaeruddin (2020) yaitu pada kisaran 95,93-98,52%. Viabilitas spermatozoa *post thawing* berbeda nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan. Viabilitas tertinggi terdapat pada perlakuan P1 (Glisin 60 mM) dan P3 (Glisin 60 mM + fruktosa 80 mM). Hasil menunjukkan bahwa penambahan glisin

dalam Ringer laktat membantu mempertahankan viabilitas spermatozoa ayam kampung selama pembekuan. Hal ini diduga karena glisin berperan sebagai antioksidan.



Gambar 1. Hasil pengamatan viabilitas. Spermatozoa mati (panah merah) dan hidup (panah hitam).

Glisin adalah asam amino yang memiliki kemampuan antioksidan, sehingga dapat ditambahkan ke dalam pengencer semen (Junaedi *et al.*, 2024a). Penelitian lainnya juga telah menunjukkan bahwa penambahan glisin dalam pengencer secara efektif menjaga kualitas spermatozoa sapi jantan dan kerbau (El-Sheshtawy *et al.*, 2008). Senyawa ini bekerja dengan menstabilkan membran plasma spermatozoa dan mengurangi stres osmotik yang terjadi selama proses pembekuan dan pencairan. Glisin memiliki sifat antioksidan dan menunjukkan efek penangkapan radikal bebas (Nazif *et al.*, 2022). Glisin menghambat aktivasi *oxidative burst* (ledakan oksidatif/produksi spesies oksigen reaktif besar-besaran), dan efek ini tidak melalui reseptor glisin yang membuka saluran klorida, tetapi kemungkinan bekerja langsung pada tingkat membran sel (Giambelluca & Gende, 2009).

Penurunan viabilitas spermatozoa ayam kampung yang setelah dibekukan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan, penurunan viabilitas paling rendah yaitu perlakuan P1 dan P3, menunjukkan glisin mampu menekan penurunan penurunan viabilitas selama pembekuan.

Tabel 2. Viabilitas spermatozoa ayam kampung (%) yang dibekukan dengan pengencer yang mengandung glisin dan fruktosa

Perlakuan	<i>Before freezing</i>	<i>Post thawing</i>	Penurunan viabilitas
P0	93,50±1,28	46,57±5,94 ^a	47,51±5,58 ^a
P1	94,09±1,05	70,60±9,43 ^b	23,83±8,86 ^b
P2	94,57±0,89	66,78±7,11 ^{ab}	27,79±6,96 ^{ab}
P3	94,98±1,60	77,12±5,39 ^b	16,38±5,78 ^b

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

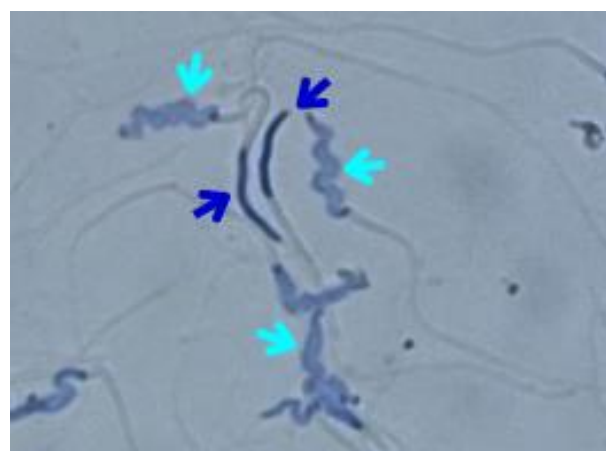
Penggunaan fruktosa tidak mampu mempertahankan viabilitas dibandingkan glisin. Hal ini mungkin disebabkan masalah utama pada semen beku ayam bukan terletak pada kekurangan energi, melainkan pada kerusakan membran sel akibat *cold shock* dan pembentukan kristal es, dan kristal es ini hal ini bisa dicegah dengan krioprotektan. Sedangkan menurut Duplaix & Sexton (1983), fruktosa, tidak dapat dikatakan bahwa berfungsi sebagai krioprotektan secara tunggal atau bersamaan dengan DMSO.

Proses kriopreservasi menyebabkan penurunan viabilitas dalam penelitian ini dengan penurunan sebesar 16,38-47,51%. Selama proses kriopreservasi, spermatozoa dapat mengalami kematian sel yang disebabkan oleh stres oksidatif, apoptosis dan pembentukan kristal sel intraseluler (Hai *et al.*, 2024).

Fragmentasi DNA Spermatozoa

Hasil pengamatan Fragmentasi DNA pada penelitian ini terlihat pada Gambar 2. Kepala spermatozoa yang berwarna biru terang diidentifikasi memiliki DNA yang utuh sedangkan yang berwarna biru gelap diidentifikasi memiliki DNA yang rusak. Warna biru gelap pada kepala spermatozoa disebabkan penyerapan toulidine *blue*. Spermatozoa dengan DNA utuh memiliki kepadatan DNA yang tinggi sehingga toulidine *blue* tidak mampu berikatan dengan gugus fosfat DNA tersebut, sedangkan DNA yang rusak susunannya lebih renggang dan memungkinkan toulidine *blue* mampu berikatan dengan gugus fosfat sehingga

menyebabkan warna biru pekat (Nasr-Esfahani & Tavalee, 2021).



Gambar 2. Hasil pengamatan fragmentasi DNA. DNA utuh (panah biru muda) dan DNA terfragmentasi (panah buru tua).

Hasil penelitian ini menunjukkan fragmentasi DNA pada spermatozoa ayam sebelum pembekuan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) antar perlakuan. Fragmentasi DNA sebelum pembekuan berada pada kisaran 3,60-5,32% lebih rendah dari penelitian Gliozzi *et al.* (2011) yaitu pada kisaran 6,24 – 2,47% dari ras ayam lokal italia dengan metode uji komet atau elektroferesis gel sel tunggal (SCGE) untuk mendeteksi fragmentasi DNA pada tingkat sel individu. Hasil penelitian menunjukkan fragmentasi DNA pada spermatozoa ayam setelah pembekuan juga tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) antar perlakuan. DNA setelah pembekuan berada pada kisaran 6,51-9,61% lebih rendah dari

Tabel 3. Fragmentasi DNA spermatozoa ayam kampung (%) yang dibekukan dengan pengencer yang mengandung glisin dan fruktosa

Perlakuan	<i>Before freezing</i>	<i>Post thawing</i>	Peningkatan fragmentasi DNA
P0	3,60±1,20	6,51±1,34	4,32±0,61
P1	4,82±1,30	7,69±1,33	2,37±0,15
P2	5,29±0,06	8,92±0,88	2,91±0,71
P3	5,32±1,64	9,61±0,97	4,09±0,55

penelitian Giozzi *et al.* (2011) yaitu pada kisaran 19,82 – 2,47%.

Penambahan glisin dan fruktosa tidak memengaruhi fragmentasi DNA spermatozoa diduga karena glisin dan fruktosa tidak memiliki kapasitas yang cukup untuk masuk ke dalam inti sel dan melindungi rantai DNA dikarenakan DNA spermatozoa dikemas sangat padat oleh protein khusus bernama protamin. Walaupun demikian terjadi sedikit peningkatan fragmentasi DNA spermatozoa ayam kampung setelah dibekukan dengan kisaran 2,37-4,32% mendekati hasil penelitian Wahjuningsih *et al.* (2026) yaitu pada kisaran 4,26% menggunakan krioprotektan DMSO pada ayam Gaga dan Robbaani *et al.* (2025), yaitu pada kisaran 3-5% menggunakan krioprotektan etilen glikol pada semen ayam Gaga.

Peningkatan fragmentasi DNA *post thawing* diduga karena efek stres oksidatif. Menurut Zong *et al.* (2023) menjelaskan bahwa salah satu mekanisme utama fragmentasi DNA adalah stres oksidatif dimana pembekuan dan pencairan memicu peningkatan produksi *spesies oksigen reaktif* (ROS) Molekul reaktif ini menyerang membran lipid, protein struktural, serta basa nitrogen DNA, sehingga menyebabkan fragmentasi DNA dan menurunkan integritas genom sperma. Selain itu, perubahan fisik akibat kristal es serta keterbatasan mekanisme perbaikan DNA juga memperparah kerusakan. Kristal es yang terbentuk selama pembekuan dapat merusak membran plasma dan kromatin inti, sementara pelelehan kristal es saat pencairan menimbulkan tekanan osmotik yang menyebabkan fragmentasi DNA (Gliozzi *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini yaitu Penambahan glisin (60 mM) dalam pengencer ringer laktat kuning telur berperan positif dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa selama pembekuan meskipun belum menunjukkan efek protektif yang signifikan terhadap Fragmentasi DNA.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou El-Ela, A., Kandeel, A., Hassan, E., Nasr, M., & Esam, Y. (2022). Utility of magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction. *Al-Azhar International Medical Journal*, 3(11), 22-29.
- Abruzzese, G. A., Sanchez-Rodriguez, A., & Roldan, E. R. (2024). Sperm metabolism. *Molecular Reproduction and Development*, 91(10), e23772.
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Eosin-nigrosin staining procedure. In: Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R., editors. *Andrological Evaluation of Male Infertility: A Laboratory Guide*. Switzerland: Springer.
- Blesbois, E., Grasseau, I. & Seigneurin, F., (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129(3), 371-378.
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of

- preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220.
- Darni, D., Saili, T., & Rahadi, S. (2021). Kualitas spermatozoa ayam kampung dengan penambahan vitamin E dalam pakan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Halu Oleo*, 3(1), 19-22.
- Davoodian, N., Kadivar, A., Ahmadi, E., & Mohebbi, A. (2017). Effects of two amino acids on motion parameters and enzymatic antioxidant activity of freeze-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 59, 49-56.
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology*, 2012(1), 854837.
- Duplaix, M., & Sexton, T. J. (1983). Effects of prefreeze treatments on the fertilizing capacity of unfrozen and frozen chicken semen: extender characteristics and dilution method. *Poultry Science*, 62(11), 2255-2260.
- Echeverría, C. E., Oyarzún, V. I., López-Cortés, A., Cancino, J., Sotomayor, P. C., Goncalves, M. D., & Godoy, A. S. (2024). Biological role of fructose in the male reproductive system: Potential implications for prostate cancer. *The Prostate*, 84(1), 8-24.
- El-Sheshtawy, R. I., El-Sisy, G. A., & El-Nattat, W. S. (2008). Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinaria*, 2, 146-150.
- Giambelluca, M. S., & Gende, O. A. (2009). Effect of glycine on the release of reactive oxygen species in human neutrophils. *International Immunopharmacology*, 9(1), 32-37.
- Gliozzi, T. M., Zaniboni, L., & Cerolini, S. (2011). DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75(9), 1613-1622.
- Hai, E., Li, B., Zhang, J., & Zhang, J. (2024). Sperm freezing damage: the role of regulated cell death. *Cell Death Discovery*, 10(1), 239.
- Haryuni, N., Lestariningsih, L., & Khopsoh, B. (2022). Perbaikan kualitas semen ayam kampung melalui peningkatan energi metabolisme pakan. *Journal of Science Nusantara*, 2(3), 123-129.
- Isnaeni, M., Faidiban, O. R., & Tethool, A. N. (2019). Konsentrasi dan motilitas spermatozoa ayam kampung (*Gallus domesticus*) dalam pengencer ringer laktat yang diberi tambahan minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam). *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis*, 9(2), 44-49.
- Junaedi, J., Isnaini, N., Natsir, M. H., & Susilawati, T. (2024a). Supplementation of glycine and glucose into egg yolk lactated Ringer diluent on the quality of local chicken semen stored at 5 °C for 120 Hours. *Jurnal Medik Veteriner*, 7(1).
- Junaedi, J., Isnaini, N., Natsir, M. H., & Susilawati, T. (2024b). The quality of cryopreserved semen of local chickens treated with Ringer's lactate-egg yolk extender supplemented with glycine and glucose. *Tropical Animal Science Journal*, 47(2), 161.
- Junaedi, J., Sumantri, C., & Gunawan, A. (2016). Penggunaan dimethyl sulfoxide

- sebagai krioprotektan dalam pembekuan semen ayam kampung. *Jurnal Veteriner*, 17(2), 300-308.
- Khaeruddin, A. N., Ardi, N., Fattah, A. H., & Armayanti, A. K. (2020a). Penentuan konsentrasi susu skim terbaik dalam pengencer semen ayam kampung berbahan dasar Ringer laktat. *Jurnal Veteriner*, 21(2), 300-308.
- Khaeruddin, K., Arismunandar, A., & Nurda, N. (2020b). Karakteristik semen ayam kampung yang diberi minyak hati ikan kod sebagai feed suplement. *Musamus Journal of Livestock Science*, 3(1), 15-24.
- Khaeruddin, K., Ciptadi, G., Yusuf, M., & 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.
- Khaeruddin, K., Hermawansyah, H., Syamsuryadi, B., Armayanti, A. K., Fattah, A. H., Mangalisu, A., Kurniawan, M. E., Yustisia, D., Alamsyah, R., & Pardi, P. (2026). Practical use of amino acids in diluent to sustain native chicken sperm quality during 5 °C storage. *Journal of Animal Health and Production*, 14(2), 670-677.
- Khaeruddin, K., Junaedi, J., & Hastuti, H. (2020c). Cryopreservation of Indonesian native chicken semen by using dimethyl sulfoxide and various level of ethylene glycol as cryoprotectants. *Biodiversitas*, 21(12), 5718-5722.
- Khaeruddin, K. (2020). Pembekuan spermatozoa ayam kampung dengan suplementasi bovine serum albumin dan putih telur dalam pengencer ringer laktat kuning telur. *Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production*, 21(2), 111-222.
- Khaeruddin, K., Sumantri, C., Darwati, S., & Arifiantini, R. I. (2015). Penggunaan minyak zaitun ekstra virgin ke dalam bahan pengencer semen terhadap kualitas spermatozoa ayam lokal. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 3(1), 46-51.
- Khaeruddin, K., Syamsuryadi, B., Fattah, A. H., & Hermawansyah, H. (2025). *Teknologi Reproduksi Ternak Jantan*. Jambi: PT. Sonpedia Publishing Indonesia.
- Khairuddin, K., Kurniawan, M. E., & Soman, S. (2019). Cryopreservation of Kampung rooster semen using egg yolk diluent from four types of poultry with different concentrations. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 13(3), 60-65.
- Koohestanidehaghi, Y., Torkamanpari, M., Shirmohamadi, Z., Lorian, K., & Vatankhah, M. (2021). The effect of cysteine and glutamine on human sperm functional parameters during vitrification. *Andrologia*, 53(1), e13870.
- Kusumawati, E. D, Krisnaningsih, A. T. N, & Walangara, A. U. K. (2020). Kualitas spermatozoa ayam kampung dan ayam Arab dengan lama simpan yang berbeda pada suhu ruang. *Jurnal Sains Peternakan*, 8 (1), 41-56.
- Lake, P. E. (1957). Fowl semen as collected by the massage method. *The Journal of Agricultural Science*, 49(1), 120-126.
- Long, J. A., (2014). Applied andrology in chickens and turkeys. In: Chenoweth, P. J., & Lorton, S. P. (Eds). *Animal*

- Andrology. Theories and Applications. Boston MA, USA: CABI.
- Magfira, M., Karja, N. W. K., Arifiantini, R. I. & Sartika, T. (2023). Effect of carbohydrate type and phenotype on the quality of post-thawing frozen semen of KUB chicken. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 28(1), 56-78.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.
- Mussa, N. J., Rtchamak, 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 cryopreserved semen quality. *Tropical Animal Health and Production*, 53,1-9.
- Nasr-Esfahani, M. & Tavalae, M. (2021). Sperm Chromatin Structure: Toluidine Blue Staining. In: A. Agarwal, R. Henkel, and A. Majzoub (Eds.) *Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction*. England: Cambridge University Press.
- Nazif, M. S., Rehman, Z. U., Khan, H., Khan, F. A., Hussain, T., Ahmad, A., Farmanullah, F., Husnain, A., Muhammad, S., Murtaza, G. & Gang, L. (2022). Glycine improved cryopreserved spermatozoa quality in Achai bull. *BioMed Research International*, 2022(1), 8282387.
- Ni, W., Xiao, S., Qiu, X., Jin, J., Pan, C., Li, Y., Fei, Q., Yang, X., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Effect of Sperm DNA fragmentation on clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer and on blastocyst formation. *PLoS ONE*, 9, e94956.
- Pimprasert, M., Kheawkanha, T., Boonkum, W., & Chankitisakul, V. (2023). Influence of semen collection frequency and seasonal variations on fresh and frozen semen quality in Thai native roosters. *Animals*, 13(4), 573.
- Robbaani, M., Khaeruddin, K., Rachmawati, A., Nursita, I. W., & Wahjuningsih, S. (2025). The use of ethylene glycol cryoprotectant with varying concentrations on the integrity of the plasma membrane and DNA damage in Gaga chickens semen. *The 11th International Conference of Innovation in Animal Science (ICIAS 2024)*. pp. 95-103, Atlantis Press.
- Rui, B. R., Angrimani, D. S., Losano, J. D. A., de Cássia Bicudo, L., Nichi, M., & Pereira, R. J. (2017). Validation of simple and cost-effective stains to assess acrosomal status, DNA damage and mitochondrial activity in rooster spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 187, 133-140.
- Ruiz, E. D., Bermejo, J. V. D., González, F. J. N., Jurado, J. M. L., & Ariza, A. G. (2025). Packaging with lower sperm concentrations improves post-thawing quality parameters of rooster semen. *Italian Journal of Animal Science*, 24(1), 89-100.
- Salam, L.O.M.A., Zulkaranin, L.O. M. I., Ramadhani, R., Junaedi, J., & Khaeruddin, K. (2025). Motility and viability of kampung chicken sperm using diluents containing glycine and glucose. *Tarjih Tropical Livestock Journal*, 5(2), 166-175.

- Sangeeta, S., Arangasamy, A., Kulkarni, S., & Selvaraju, S. (2015). Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 161, 82-88.
- Sharma, R., & Agarwal, A. (2021). Sperm vitality: Eosin-nigrosin dye exclusion. In: Agarwal, A., Henkel, R., & Majzoub, A. (Eds), *Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction*. England: Cambridge University Press.
- Sun, Y., Xue, F., Li, Y., Fu, L., Bai, H., Ma, H., Xu, S., & Chen, J. (2019). Differences in semen quality, testicular histomorphology, fertility, reproductive hormone levels, and expression of candidate genes according to sperm motility in Beijing-You chickens. *Poultry Science*, 98(9), 4182-4189.
- 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.
- Wahjuningsih, S., Khaeruddin, K., Rachmawati, A., Tribudi, Y. A., Sari, A. P. Z. N. L., Wahyu 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.
- Wang, Q., Gu, X., Chen, Y., Yu, M., Peng, L., Zhong, S., Wang, X., & Lv, J. (2023). The effect of sperm DNA fragmentation on in vitro fertilization outcomes of unexplained infertility. *Clinics*, 78, 100261.
- Widyasanti, N. W. H., Suriansyah, S., Yaddi, Y., Archadiya, M., Khaeruddin, K., Yusuf, R., Magfira, M., Aldiyanti, A., Yunitasari, F., Sulfitriana, A., Yuska, D.A.T & Pancar, F. M. (2025). *Reproduksi Ternak Unggas*. Padang: Azzia Karya Bersama.
- Wijaya, G. H., Fatmarischa, N., Falah, F. D. S., Salsabila, N., Yusuf, R., Toelle, N. N., Khaeruddin, K., Adam, K. A., Herlambang, N., Rizkuna, A., & Djunaidi, I. H. (2026). *Ilmu dan Teknologi Ternak Unggas*. Padang: Azzia Karya Bersama.
- 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.