

Analisis Kalsium Intraseluler dan Ultrastruktur Spermatozoa Ayam yang Dibekukan

Khaeruddin

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

INFORMASI ARTIKEL

Diterima 29 Desember 2024
 Hasil revisi diterima 31
 Desember 2024
 Diterbitkan 31 Desember
 2024
 Publish online 31 December
 2024

Kata-kata kunci:
 Kalsium intraseluler;
 Ultrastruktur;
 SEM;
 Spermatozoa ayam;
 Pembekuan;

DOI: 10.47030/trolija.v4i2.899

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 29 December
 2024
 Received in revised from
 31 December 2024
 Accepted 31 December
 2024
 Available online 31
 December 2024

Key words:
 Intracellular calcium;
 Ultrastructure;
 SEM;
 Chicken sperm;
 Freezing;

DOI: 10.47030/trolija.v4i2.899

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui intensitas kalsium (Ca^{2+}) intraseluler dan ultrastruktur pada beberapa bagian spermatozoa ayam setelah pembekuan. Analisis intensitas Ca^{2+} intraseluler menggunakan *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) pada akrosom, kepala, bagian tengah dan ekor spermatozoa ayam sebelum dan setelah pembekuan, serta analisis Ca^{2+} juga dilakukan pada setiap lapisan spermatozoa. Analisis ultrastruktur spermatozoa menggunakan *field emission-scanning electrom microscopy* (FE-SEM) setelah pembekuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa intensitas Ca^{2+} intraseluler lebih tinggi pada bagian akrosom dan bagian tengah, sedangkan pada bagian kepala dan ekor lebih rendah. Proses pembekuan-*thawing* menyebabkan peningkatan intensitas Ca^{2+} intraseluler di semua bagian spermatozoa. Intensitas Ca^{2+} intraseluler pada lapisan bagian tengah lebih tinggi dibandingkan pada bagian permukaan atas dan bawah spermatozoa. Pengamatan ultrastruktur menunjukkan adanya kerusakan pada bagian tengah, terlepasnya tudung akrosom, ekor melipat dan ujung ekor yang sedikit terbelah setelah pembekuan-*thawing*.

ABSTRACT

The study aims to determine the intensity of intracellular calcium (Ca^{2+}) and ultrastructure in several parts of chicken spermatozoa after freezing. Analysis of intracellular Ca^{2+} intensity using confocal laser scanning microscopy (CLSM) on the acrosome, head, middle and tail of chicken spermatozoa before and after freezing and Ca^{2+} analysis was also carried out on each layer of spermatozoa. Analysis of spermatozoa ultrastructure using field emission-scanning electrom microscopy (FE-SEM) after freezing. The results showed that the intensity of intracellular Ca^{2+} was higher in the acrosome and middle parts, while in the head and tail parts it was lower. The freezing-thawing process causes an increase in intracellular Ca^{2+} intensity in all parts of spermatozoa. The intensity of intracellular Ca^{2+} in the middle layer is higher than on the upper and lower surfaces of spermatozoa. Ultrastructural observations showed damage to the middle part, detachment of the acrosome cap, folded tail and slightly split tail tip after freezing-thawing.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan teknologi inseminasi buatan (IB) merupakan langkah yang tepat digunakan dalam manajemen perkawinan ayam, karena efisien dan mengoptimalkan pemanfaatan spermatozoa pejantan unggul jika dibandingkan kawin alami (Khaeruddin *et al.*, 2020b). Pembekuan spermatozoa ayam memiliki peranan penting dalam bidang peternakan unggas, terutama untuk pemuliaan dan pengelolaan genetika. Teknik ini memungkinkan penyimpanan spermatozoa ayam jangka panjang tanpa mengurangi kualitas atau daya fertilisasi, sehingga peternak dapat melakukan inseminasi buatan secara efisien meskipun tanpa harus mendatangkan pejantan secara langsung. Pembekuan spermatozoa juga memberikan peluang untuk mempertahankan dan menyebarkan sifat-sifat unggul dari ayam pilihan secara lebih luas dan berkelanjutan, serta mendukung peningkatan produktivitas dan keberagaman genetik dalam populasi ayam.

Pembekuan (kriopreservasi) spermatozoa adalah proses penyimpanan sel jangka panjang pada suhu sangat rendah, untuk menghentikan semua aktivitas biologis dan mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh degradasi biologis (Khaeruddin *et al.*, 2024). Namun, pembekuan spermatozoa ayam dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa setelah pencairan kembali (*post thawing*) (Khaeruddin & Kurniawan, 2020). Motilitas spermatozoa ini berkaitan dengan intensitas ion kalsium (Ca^{2+}) intraseluler.

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa homeostasis Ca^{2+} terbukti penting untuk menjaga motilitas spermatozoa ayam secara *in vitro* (Froman, 2016). Pengaturan Ca^{2+} di dalam sel berpengaruh terhadap motilitas dan reaksi akrosom pada spermatozoa, yang penting dalam proses penetrasi telur (Sushadi *et al.*, 2023). Mekanisme Ca^{2+} dalam motilitas melibatkan pengaktifan enzim yang berperan dalam menjaga homeostasis energi di dalam sel (Nguyen *et al.*, 2016b). Kajian intensitas

kalsium spermatozoa ayam menjadi penting untuk memahami hubungannya penurunan motilitas *post thawing*.

Spermatozoa ayam lebih rentan terhadap kerusakan selama proses pembekuan karena rasio luas permukaan terhadap volume yang relatif lebih rendah dan ekor yang lebih tipis dibandingkan dengan beberapa spesies mamalia (Mohammad *et al.*, 2021). Penelitian kerusakan ataupun abnormalitas spermatozoa ayam secara umum diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran yang terbatas, pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop elektron pada skala ultrastruktur penting dilakukan untuk melihat kerusakan spermatozoa secara lebih detail.

Ultrastruktur merujuk pada rincian struktur yang sangat halus dan mendalam dari suatu sel yang hanya dapat dilihat menggunakan mikroskop elektron (*scanning electron microscopy* atau *transmission electron microscopy*). Berbeda dengan mikroskop cahaya biasa, mikroskop elektron memungkinkan kita untuk mengamati struktur-struktur pada tingkat yang lebih kecil, seperti organel sel atau bagian-bagian kecil pada permukaan sel.

Analisa ultrastruktur dapat digunakan untuk mengamati deformitas intuitif pada kepala sperma (nukleus), bagian tengah dan mitokondria yang disebabkan oleh cedera akibat pembekuan (Shi *et al.*, 2014). Mengamati ultrastruktur spermatozoa ayam yang dibekukan menggunakan teknik SEM sangat penting untuk mengevaluasi kerusakan atau perubahan morfologi yang mungkin terjadi selama proses pembekuan, sehingga dapat meningkatkan pemahaman dan optimasi prosedur pembekuan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui intensitas Ca^{2+} intraseluler dan ultrastruktur pada beberapa bagian spermatozoa ayam setelah pembekuan.

METODE

Penyiapan Pengencer

Pengencer semen yang digunakan adalah Ringer laktat kuning telur (Khaeruddin *et al.*, 2016), ditambahkan antibiotik penisilin 1000 IU dan streptomisin 1 mg/ml dan pH pengencer disesuaikan dengan *tris hydroxymethyl aminomethane* (Khaeruddin *et al.*, 2020a). Krioprotektan yang digunakan dalam pengencer adalah *dimethyl sulfoxide* dengan konsentrasi 7% (Khaeruddin *et al.*, 2020c).

Koleksi dan Evaluasi Semen

Semen dikoleksi dari 3 ekor ayam lokal pejantan (Gaga) umur >10 bulan dengan metode pemijatan abdominal, kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen dengan motilitas spermatozoa >80% dan abnormalitas <10% dilanjutkan ke tahap pengenceran dan pembekuan

Tahap Pembekuan Semen

Semen diencerkan dan dikemas dalam straw, kemudian diekuilibrasikan pada suhu 5 °C selama 2 jam (Wahjuningsih *et al.*, 2024). Selanjutnya dilakukan *pre-freezing* dengan menempatkan straw di atas permukaan nitrogen cair setinggi 3 cm (Madeddu *et al.*, 2016), selama 10 menit (Mosca *et al.*, 2016). Straw kemudian dimasukkan dalam kontainer untuk dibekukan dalam nitrogen cair selama 24 jam sebelum *thawing*. *Thawing* semen dilakukan pada suhu 37 °C selama 30 detik (Salih *et al.*, 2021).

Analisis Intensitas Kalsium Intraseluler

Preparasi sampel dan analisis intensitas Ca^{2+} intraseluler dilakukan berdasarkan Khaeruddin *et al.* (2024a). Semen 50 μ l diencerkan dengan 150 μ l *phosphate buffered saline* (PBS) kemudian disentrifius 6000 rpm selama 2 menit. *Pellet* hasil sentrifius 10 μ l ditambahkan 10 μ l pewarna Fluo-3 (Sigma-Aldrich, US), ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu ruang dengan kondisi gelap selama 30 menit. Sampel

ditambahkan PBS hingga volumenya 150 μ l kemudian dicuci 3 kali dengan cara disentrifius 6000 rpm selama 2 menit. *Pellet* hasil pencucian diencerkan dengan 30 μ l PBS dan dihomogenkan kemudian diteteskan pada *cover slip* ditutup dengan *cover slip*.

Intensitas kalsium diukur menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) (Olympus FV1000, Jepang), dengan teknik pengirisan spermatozoa dengan laser. Pengamatan intensitas Ca^{2+} pada akrosom, kepala, bagian tengah dan ekor dilakukan pada terhadap 13 sel spermatozoa sebelum dan 13 sel spermatozoa setelah pembekuan. Pengamatan intensitas Ca^{2+} pada tiap lapisan spermatozoa dilakukan pada 6 sel spermatozoa sebelum pembekuan dan 6 sel setelah pembekuan.

Analisis Ultrastruktur Spermatozoa

Pengamatan ultrastruktur spermatozoa menggunakan *Field Emission Scanning Electron Microscopy* (FE-SEM) (FEI Quanta 600, US). Preparasi sampel dilakukan dengan cara semen dicuci dengan NaCl fisiologis kemudian difiksasi glutaraldehid 2,5% (3-4 jam), pencucian *buffer phosphate* pH 8 3 x 5 menit, dicuci dengan PBS 3 x 5 menit, dehidrasi dengan alkohol bertingkat 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% kemudian dilakukan penempelan stub dan dilapisi (*coating*) dengan emas ketebalan 6 nm selama 35 detik menggunakan *sputter coating* kemudian dianalisis FESEM perbesaran 1500-10000x dengan tegangan akselerasi 10 kV.

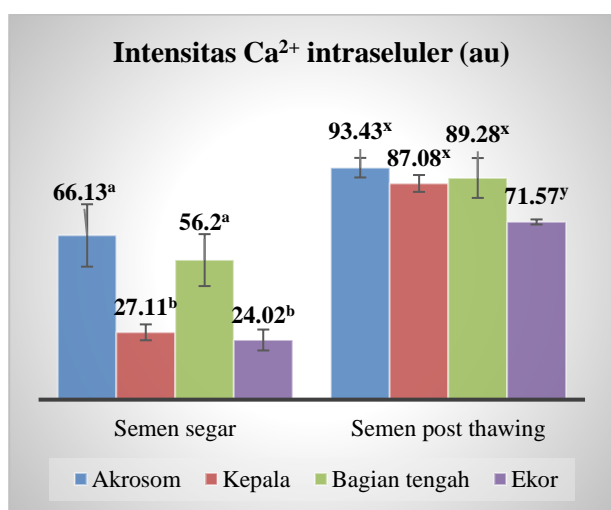
Analisis Data

Data konsentrasi kalsium pada setiap bagian spermatozoa dianalisis sidik ragam (ANOVA), perbedaan antar bagian dianalisis dengan uji jarak berganda Duncan menggunakan *software* SPSS 25. Sedangkan data konsentrasi kalsium pada tiap lapisan dan pengamatan ultrastruktur disajikan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kalsium Intraseluler

Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi ion kalsium (Ca^{2+}) berbeda pada setiap bagian spermatozoa (Gambar 1). Konsentrasi Ca^{2+} spermatozoa ayam lebih tinggi pada bagian akrosom dan bagian tengah jika dibandingkan bagian kepala dan ekor pada semen segar (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Konsentrasi Ca^{2+} intraseluler pada beberapa bagian spermatozoa pada semen segar dan semen *post thawing*.

Keterangan: Superskrip ^{ab} menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ($P < 0,01$) dan superskrip ^{xy} menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$)

Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya pada spermatozoa manusia yang diwarnai dengan Fluo-3 menunjukkan konsentrasi ion Ca^{2+} bebas dalam jumlah yang tinggi pada bagian tengah (Kotwicka *et al.*, 2016). Organel spermatozoa yang menyimpan Ca^{2+} adalah bagian anterior (akrosom) dan bagian tengah. Mitokondria adalah organel di bagian tengah yang merupakan tempat akumulasi sejumlah besar Ca^{2+} (Costello *et al.*, 2009). Akumulasi Ca^{2+} ke dalam mitokondria mengatur metabolisme mitokondria dan menyebabkan depolarisasi sementara potensial membran mitokondria (Duchen, 2000). Peran

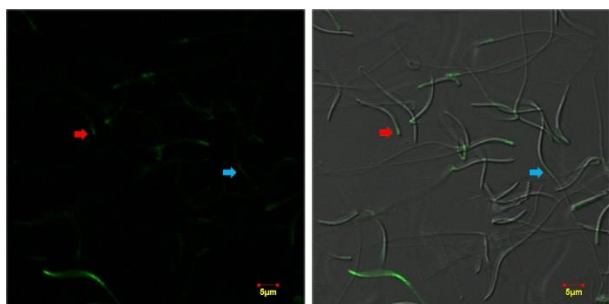
mitokondria dalam homeostasis Ca^{2+} sangat penting karena sebagai ruang sel utama yang terlibat dalam produksi *adenosine triphosphate* (ATP) dan karena ada hubungan antara kadar Ca^{2+} mitokondria dan dinamika, fungsi, dan metabolisme mitokondria (Romero-Garcia & Prado-Garcia, 2019).

Nguyen *et al.* (2016b) melaporkan bahwa beberapa tipe saluran kalsium terdeteksi kuat pada bagian akrosom dan bagian tengah spermatozoa ayam, sedangkan pada bagian ekor jauh lebih rendah, sehingga saluran ini mungkin terlibat dalam masuknya Ca^{2+} pada akrosom dan bagian tengah spermatozoa ayam yang berperan dalam reaksi akrosom dan motilitas spermatozoa. Penelitian Korobkin *et al.* (2021) pada spermatozoa manusia menunjukkan bahwa ion kalsium memasuki sitosol melalui saluran kalsium yang terbuka pada membran dan kemudian berdifusi ke bagian tengah spermatozoa. Mobilisasi ion Ca^{2+} dari salah satu simpanan internal pada bagian spermatozoa ke dalam akrosom akan mengakibatkan peningkatan konsentrasi Ca^{2+} pada akrosom (Cohen *et al.*, 2022).

Masuknya Ca^{2+} ekstraseluler ke dalam sel spermatozoa mengatur produksi ATP mitokondria, terlibat langsung dalam regulasi energi melalui stimulasi fosforilasi *adenosine monophosphate - activated protein kinase* (AMPK) pada spermatozoa ayam yang berperan penting pada fungsi spermatozoa yaitu motilitas dan reaksi akrosom (Nguyen *et al.*, 2014; 2016a; 2016b).

Ca^{2+} berperan dalam berbagai proses seluler dan disimpan dalam sel dengan konsentrasi rendah dalam bentuk bebas untuk menghindari kerusakan, dibandingkan dengan konsentrasi ekstraseluler yang lebih tinggi (Matuz-Marez *et al.*, 2022). Perlakuan pembekuan dan pencairan kembali (*post thawing*) menyebabkan peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler semua bagian spermatozoa (Gambar 1). Peningkatan kalsium intraseluler dapat terjadi melalui pelepasan Ca^{2+} dari penyimpanan intraseluler atau

masuknya Ca^{2+} melintasi membran plasma (Nguyen *et al.*, 2016b).



Gambar 2. Hasil pewarnaan spermatozoa dengan Fluo 3

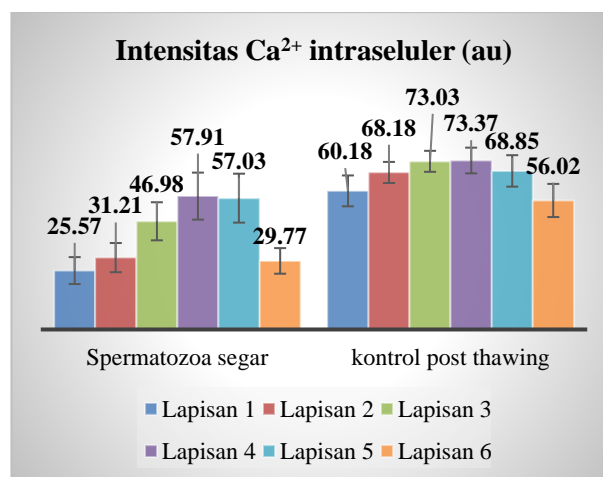
Keterangan: Gambar *fluorescence* (kiri) dan *differential interference contrast + fluorescence (Super infuse)* (Kanan). Panah merah menunjukkan pendaran warna pada akrosom dan panah biru menunjukkan pendaran warna pada bagian tengah

Membran sel merupakan salah satu lokasi utama yang mengalami cedera selama pembekuan dan *thawing* pada proses kriopreservasi sel. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh efek drastis pembentukan es pada keadaan fase membran, yang akan mempengaruhi parameter permeabilitas membran (Oldenhof *et al.*, 2010). Peningkatan permeabilitas membran akibat pendinginan ini memungkinkan Ca^{2+} mampu menembus sel (Robertson & Watson, 1986). Peningkatan Ca^{2+} intraseluler setelah pembekuan juga dilaporkan pada spermatozoa sapi (Treulen *et al.*, 2018) dan kuda (Yeste *et al.*, 2015).

Kelebihan Ca^{2+} merugikan fungsi mitokondria dan dapat menjadi penyebab penting pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) pada mitokondria (Peng & Jou, 2010). Akumulasi kalsium yang berlebih dapat mengganggu fungsi mitokondria, menyebabkan penurunan produksi ATP dan peningkatan pelepasan spesies oksigen reaktif (ROS) (Santulli *et al.*, 2015). Menurut Kotwicka *et al.*, (2016), konsentrasi Ca^{2+} bebas yang berlebihan di dalam mitokondria berkaitan dengan penurunan potensial membran mitokondria yang signifikan.

Mitokondria spermatozoa berperan penting dalam homeostasis Ca^{2+} . Peristiwa yang mungkin terkait dengan gangguan mitokondria seperti peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler berdampak pada penurunan kualitas semen selama penyimpanan atau berdampak pada fungsi mitokondria (Sushadi *et al.*, 2023).

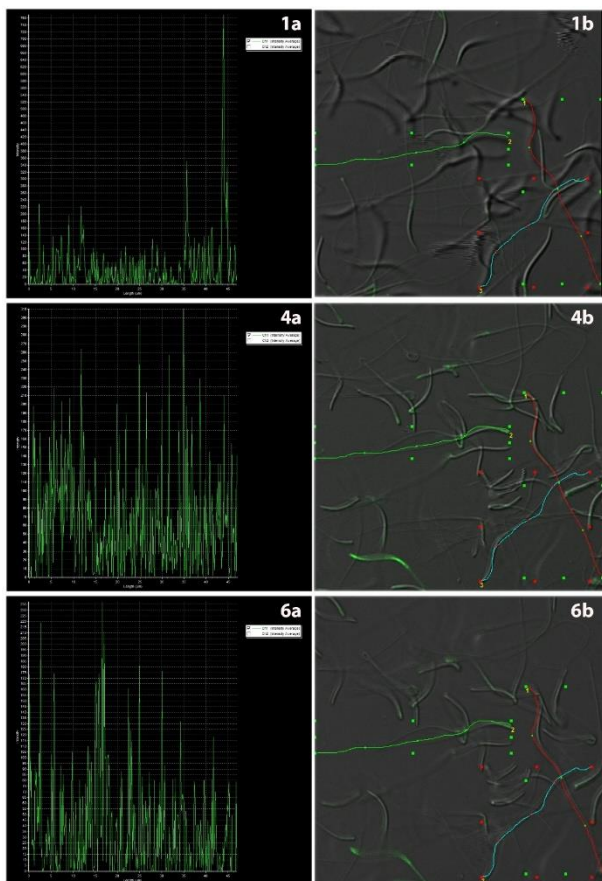
Penelitian Schuh *et al.* (2004) mendukung hipotesis bahwa enzim Ca^{2+} -ATPase diperlukan untuk regulasi fungsi spermatozoa dan level Ca^{2+} intraseluler. Ca^{2+} -ATPase pada membran plasma berperan penting untuk mengatur homeostasis Ca^{2+} seluler (Gong *et al.*, 2018). Pendinginan menyebabkan kerusakan membran karena terjadi hidrolisis membran dan kerusakan fungsi Ca^{2+} -ATPase (Sieme *et al.*, 2015; Jin & Yang, 2017).



Gambar 3. Hasil analisis konsentrasi Ca^{2+} intraseluler pada tiap lapisan *slicing* spermatozoa

Gangguan fungsi membran sel dan mitokondria tersebut menjelaskan rendahnya kualitas spermatozoa ayam *post thawing* seperti laporan pada penelitian-penelitian sebelumnya (Khaeruddin *et al.*, 2024a; 2020c). Penelitian Froman (2016) menunjukkan bahwa peningkatan permeabilitas Ca^{2+} selama penyimpanan dingin bisa berdampak pada penurunan motilitas spermatozoa dan potensi pembuahan pada unggas. Keshtgar *et al.* (2016) bahwa peningkatan Ca^{2+} intraseluler

secara langsung ataupun karena produksi ROS yang meningkat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Proses kriopreservasi secara signifikan menurunkan persentase sel spermatozoa hidup dengan Ca^{2+} intraseluler yang tinggi (Ebrahimi & Keshtgar, 2020).



Gambar 4. Hasil analisis intensitas Ca^{2+} pada 3 lapisan spermatozoa

Keterangan: Grafik intensitas kalsium (sampel semen segar) dari kepala hingga ekor (a), gambar superimpose spermatozoa (b). Lapisan pertama (1), lapisan keempat (4) dan lapisan keenam (6).

CLSM berbeda dengan mikroskop optik konvensional atau mikroskop fluoresensi, karena menggunakan sumber laser dan perangkat pemindaian berdasarkan pencitraan mikroskop fluoresensi dan menerapkan

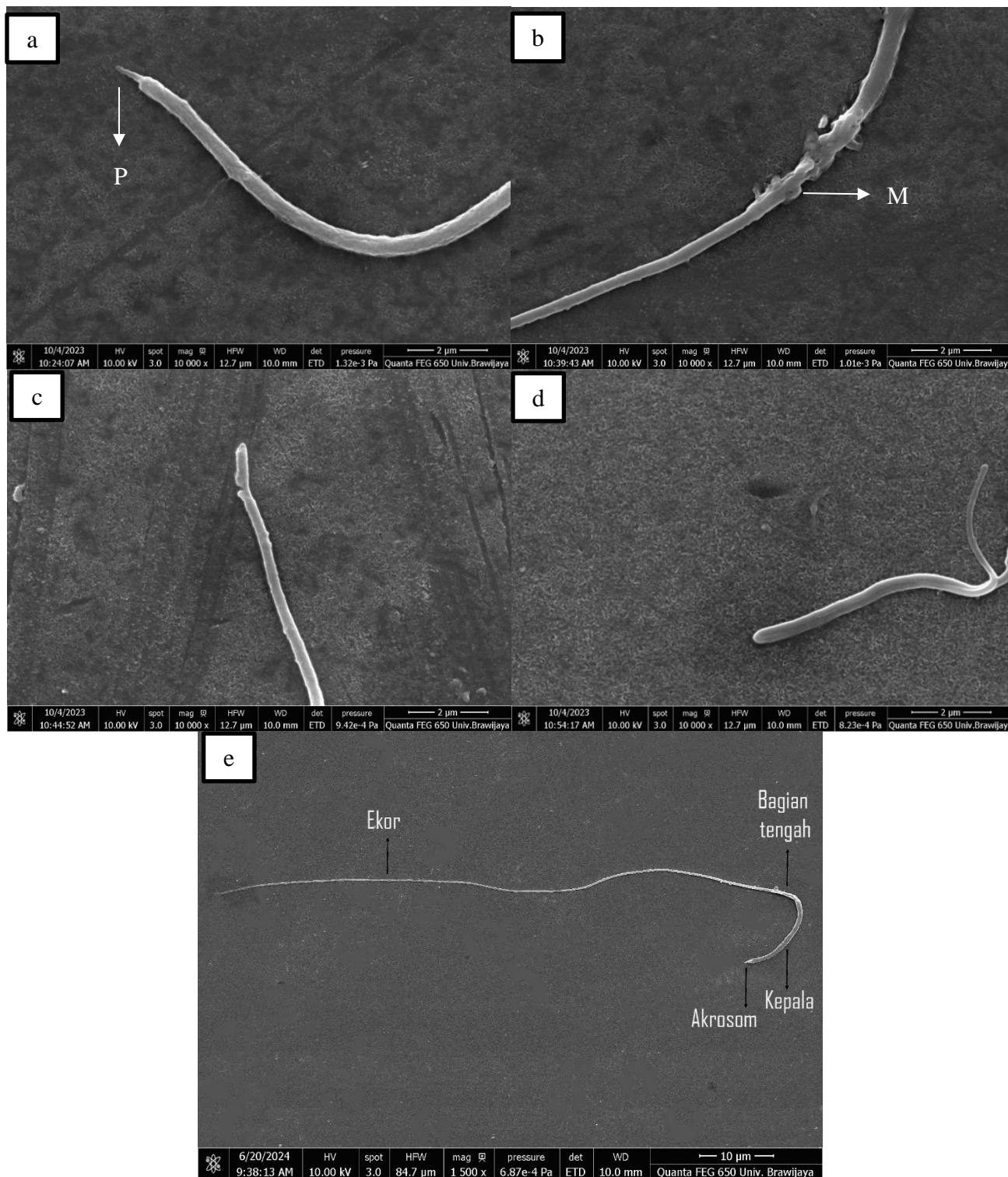
perangkat pemfokusan konjugasi berdasarkan mikroskop optik tradisional untuk mencapai pemindaian setiap lapisan dan pencitraan sampel (Zhang *et al.*, 2019).

Hasil pemindaian spermatozoa ayam pada tiap lapisan dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4. Gambar tersebut menunjukkan irisan tipis pada permukaan atas spermatozoa (lapisan pertama) memiliki intensitas Ca^{2+} yang rendah. Pengirisan pada lapisan bagian dalam (lapisan keempat) menunjukkan intensitas Ca^{2+} yang lebih tinggi. Sedangkan lapisan permukaan spermatozoa bagian bawah (lapisan keenam) memiliki intensitas Ca^{2+} yang rendah.

Ultrastruktur Spermatozoa

Hasil analisis kerusakan spermatozoa ayam setelah pembekuan dengan menggunakan SEM dapat dilihat pada Gambar 5. Kerusakan terlihat pada bagian kepala yaitu terlepasnya tudung akrosom yang menyisakan perforatorium. Hasil ini serupa dengan laporan Olexikova *et al.* (2018) yang menunjukkan kerusakan pada akrosom spermatozoa ayam setelah pembekuan yaitu terlepasnya tudung akrosom dari kepala, hilangnya zat di sekitar perforatorium dan kesenjangan tudung akrosom dengan perforatorium. Demikian juga dengan laporan Zong *et al.* (2023) bahwa pembekuan menyebabkan adanya ruang yang lebih besar antara akrosom dan perforatorium pada spermatozoa ayam.

Hasil ini sejalan dengan penelitian pada spermatozoa mamalia setelah pembekuan. Zampini *et al.* (2020) melaporkan adanya kerusakan membran akrosom akibat proses pembekuan pada spermatozoa Llama. Laporan Abdelnour *et al.* (2020) pada spermatozoa kelinci juga memiliki kecenderungan perubahan ultrastruktur membran plasma, gangguan pada membran akrosom yang



Gambar 5. Hasil pengamatan ultrastruktur spermatozoa ayam menggunakan SEM. Perbesaran 10000x: a. Kepala (P : perforatorium), b. Bagian tengah yang rusak (M : mitokondria), c. Ujung ekor terbelah, d. Ekor melipat. Perbesaran 1500x: e. Spermatozoa utuh

menyebabkan pengurangan ukuran kepala setelah pembekuan.

Membran akrosom merupakan bagian lain yang sensitif dari sel spermatozoa terhadap kerusakan selama kriopreservasi (Pesch & Bergmann, 2006). Hilangnya akrosom dikaitkan dengan tekanan mekanis yang dialami oleh spermatozoa selama pembekuan yang dapat menyebabkan reaksi akrosom prematur (Bailey *et al.*, 2000). Chen *et al.* (2024) menyatakan bahwa kriopreservasi dapat merusak membran plasma spermatozoa dan akrosom, sehingga mengakibatkan penurunan kemampuan pembuahan.

Kerusakan juga terjadi pada bagian tengah spermatozoa setelah pembekuan (Gambar 5). Bagian tengah mengandung mitokondria yang berkontribusi pada metabolisme energi (Blesbois, 2018). Hasil penelitian Zong *et al.* (2023) menyatakan bahwa pembekuan spermatozoa ayam menyebabkan kerusakan struktural pada sebagian besar spermatozoa, dan kerusakan lebih besar terjadi pada mitokondria (kepadatan matriks berkurang dan sedikit membengkak), bagian tengah, dan perforatorium dibandingkan bagian lain. Sedangkan Heng *et al.* (2022) menemukan bahwa kerusakan akibat pembekuan pada spermatozoa ayam terjadi di beberapa bagian, termasuk struktur membran (membran plasma dan inti), kepala spermatozoa, selubung mitokondria, dan mikrotubulus doublet. Analisa kerusakan ultrastruktur spermatozoa ayam yang dikriopreservasi pada studi sebelumnya menunjukkan bahwa kepadatan matriks mitokondria berkurang (Zong *et al.*, 2023), kerusakan membran plasma kepala spermatozoa dan selubung mitokondria membengkak dan terdistribusi tidak merata (Chen *et al.*, 2024).

Hasil penelitian ini juga serupa dengan yang terjadi pada spermatozoa mamalia dimana Zampini *et al.* (2020) menunjukkan spermatozoa Llama menunjukkan bagian tengah mengalami vakuolisasi, distorsi krista dan hilangnya mitokondria setelah pembekuan

yang menyebabkan penurunan potensial membran mitokondria. Sedangkan Shi *et al.* (2014) pada spermatozoa kambing setelah pembekuan menyebabkan membran plasma pecah, nukleoplasma meletus, dan disorganisasi struktural mitokondria.

Kerusakan struktur spermatozoa setelah pembekuan kemungkinan disebabkan oleh kristalisasi es, stres oksidatif, *heat shock*, dan *osmotic shock* (O'Neill *et al.*, 2019). Spermatozoa unggas memiliki jumlah asam lemak tak jenuh ganda pada membran plasma yang lebih tinggi jika dibandingkan spermatozoa dari beberapa spesies mamalia (Najafi *et al.*, 2020), hal ini diyakini menjadi salah satu penyebab spermatozoa ayam lebih rentan terhadap kerusakan dalam proses pembekuan (Zong *et al.*, 2023). ROS dapat menyerang membran plasma dan mitokondria spermatozoa yang mengakibatkan disfungsi membran plasma (Zhang *et al.*, 2021). Ketidakseimbangan antara sistem pertahanan antioksidan seluler dan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) selama pembekuan menyebabkan stres oksidatif yang menjadi penyebab utama kerusakan pada spermatozoa selama proses pembekuan (Peña *et al.*, 2019).

Kerusakan ultrastruktur pada penelitian juga ditemukan pada bagian ekor yang tampak sedikit terpotong dan adanya ekor yang melipat (Gambar 5). Hasil ini sejalan dengan laporan Woelders *et al.* (2022) bahwa sebagian besar sel spermatozoa ayam yang bermembran utuh memiliki ekor yang tertekuk setelah dibekukan menggunakan krioprotektan metilasetamid dan metilformamid.

Hal ini juga sejalan pada spermatozoa mamalia oleh laporan Zampini *et al.* (2020), bahwa beberapa sel spermatozoa Llama mengalami pembengkokan ekor, dengan permukaan yang kasar atau retak setelah pendinginan. Khalil *et al.* (2017) juga melaporkan pada spermatozoa sapi yang dibekukan menyebabkan adanya retakan pada bagian ekor. Menurut Holmes *et al.* (2020), sebagian besar spermatozoa yang terpapar kondisi hipotonik memperlihatkan perubahan

pada tampilan ekor seperti ujung ekor melingkar dan ekor terlipat. Oldenhof *et al.*, (2013), menambahkan bahwa stres hipotonik lebih merugikan daripada stres hipertonic pada spermatozoa, terutama setelah kriopreservasi karena adanya peningkatan jumlah spesies oksigen reaktif.

KESIMPULAN

Intensitas kalsium intraseluler spermatozoa ayam lebih tinggi pada bagian akrosom dan bagian tengah, sedangkan pada bagian kepala dan ekor lebih rendah. Proses pembekuan-*thawing* menyebabkan peningkatan intensitas kalsium intraseluler di semua bagian spermatozoa. Pengamatan ultrastruktur menunjukkan adanya kerusakan pada bagian tengah, terlepasnya tudung akrosom, ekor melipat dan ujung ekor yang sedikit terbelah setelah pembekuan-*thawing*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Riset Terpadu Universitas Brawijaya sebagai lokasi pengujian intensitas kalsium dan analisa SEM pada riset ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelnour, S. A., Hassan, M. A., Mohammed, A. K., Alhimaidi, A. R., Al-Gabri, N., Al-Khaldi, K. O., & Swelum, A. A. (2020). The effect of adding different levels of curcumin and its nanoparticles to extender on post-thaw quality of cryopreserved rabbit sperm. *Animals*, 10(9), 1508.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21, 1–7.
- Blesbois, E. (2018). Bird Reproduction Overview. In: Skinner, M.K. (ed). *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 6. Cambridge: Academic Press.
- Chen, X., Liu, J., Liu, Y., Li, X., An, D., Liu, X., & Zhang, L. (2024). Alpha-lipoic acid improves cryopreservation of rooster semen by reducing oxidative stress. *Poultry Science*, 103(5), 103632.
- Cohen, R., Mukai, C., Nelson, J. L., Zenilman, S. S., Sosnicki, D. M., & Travis, A. J. (2022). A genetically targeted sensor reveals spatial and temporal dynamics of acrosomal calcium and sperm acrosome exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 298(5).
- Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J., & Publicover, S. (2009). Ca^{2+} -stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction* (Cambridge, England), 138(3), 425.
- Duchen, M. R. (2000). Mitochondria and calcium from cell signaling to cell death. *The Journal of Physiology*, 529(Pt 1), 57-58.
- Ebrahimi, B., & Keshtgar, S. (2020). The effects of EGTA on the quality of fresh and cryopreserved-thawed human spermatozoa. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 45(3), 188-198.
- Froman, D. P. (2016). Deduction of a calcium ion circuit affecting rooster sperm in vitro. *Journal of Animal Science*, 94(8), 3198-3205.
- Gong, D., Chi, X., Ren, K., Huang, G., Zhou, G., Yan, N., Lei, J., & Zhou, Q. (2018). Structure of the human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 1 in complex

- with its obligatory subunit neuroplastin. *Nature Communications*, 9(1), 3623.
- Heng, N., Zhao, Z. X., Guo, Y., Gao, S., Cai, D. L., Fu, B. F., Sheng, X. H., Wang, X. G., Xing, K., Xiao, L. F., & Long, C. (2022). RhoA improves cryopreservation of rooster sperm through the Rho/RhoA-associated kinase/cofilin pathway. *Poultry Science*, 101(10), 102051.
- Holmes, E., Björndahl, L., & Kvist, U. (2020). Hypotonic challenge reduces human sperm motility through coiling and folding of the tail. *Andrologia*, 52(11), e13859.
- Jin, S. K., & Yang, W. X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: How are they regulated?. *Oncotarget*, 8, 3600–3627.
- Keshtgar, S., Iravanpour, F., Gharezi-Fard, B., & Kazerooni, M. (2016). Combined effect of Trolox and EDTA on frozen-thawed sperm quality. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 41, 230–237.
- 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., Arifiantini, R. I., Sumantri, C., & Darwati, S. (2016). Kualitas spermatozoa ayam peranakan sentul dalam pengencer ringer laktat kuning telur dengan berbagai monosakarida. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 10(2), 166-169.
- 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., Sawitri, W., Chotimah, C., & Wahjuningsih, S. (2024a). Effects of sorbitol and butylated hydroxytoluene on quality, lipid peroxidation, and intracellular calcium concentration of Gaga chicken frozen sperm. *International Journal of Agriculture and Biology*, 32, 62-70.
- 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 Journal of Biological Diversity*, 21(12), 5718-5722.
- Khaeruddin, K., & Kurniawan, M. E. (2020). Keberhasilan pembekuan semen ayam yang diencerkan dan diperkaya dengan glukosa, trehalose, sukrosa dan laktosa. *Jurnal Veteriner*, 21(3), 476-484.
- Khaeruddin, K., Wahjuningsih, S., Ciptadi, G., & Yusuf, M. (2024b). Kriopreservasi Semen Ayam. Malang: UB Press.
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E., Hassan, M. A., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, S49-S56.
- Korobkin, J., Balabin, F. A., Yakovenko, S. A., Simonenko, E. Y., & Sveshnikova, A. N. (2021). Occurrence of calcium oscillations in human spermatozoa is based on spatial signaling enzymes

- distribution. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8018.
- Kotwicka, M., Skibinska, I., Jendraszak, M., & Jedrzejczak, P. (2016). 17β -estradiol modifies human spermatozoa mitochondrial function in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14, 1-9.
- 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 Science*, 171, 58–64.
- Matuz-Mares, D., González-Andrade, M., Araiza-Villanueva, M. G., Vilchis-Landeros, M. M., & Vázquez-Meza, H. (2022). Mitochondrial calcium: Effects of its imbalance in disease. *Antioxidants*, 11(5), 801.
- 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 and Environmental Science*, 735, 12016.
- 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.
- Najafi, A., Kia, H. D., Mehdipour, M., Hamishehkar, H., & Álvarez-Rodríguez, M. (2020). Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. *Theriogenology*, 152, 122-128.
- Nguyen, T. M. D., Alves, S., Grasseau, I., Métayer-Coustard, S., Praud, C., & Froment, P., & Blesbois, E. (2014). Central role of 5'-AMP-activated Protein kinase in chicken sperm functions. *Biology of Reproduction*, 91(5), 121.
- Nguyen, T. M. D., Combarous, Y., Praud, C., Duittoz, A., & Blesbois, E. (2016a). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinases (CaMKKs) effects on AMP-activated protein kinase (AMPK) regulation of chicken sperm functions. *PLoS One*, 11(1), e0147559.
- Nguyen, T. M. D., Duittoz, A., Praud, C., Combarous, Y., & Blesbois, E. (2016b). Calcium channels in chicken sperm regulate motility and the acrosome reaction. *The FEBS Journal*, 283(10), 1902-1920.
- Oldenhof, H., Friedel, K., Sieme, H., Glasmacher, B., & Wolkers, W. F. (2010). Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 61(1), 115-122.
- Oldenhof, H., Gojowsky, M., Wang, S., Henke, S., Yu, C., Rohn, K., Wolkers, W. F., & Sieme, H. (2013). Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. *Biology of Reproduction*, 88(3), 68.
- 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.
- O'Neill, H. C., Nikoloska, M., Ho, H., Doshi, A., & Maalouf, W. (2019). Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: Comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36, 1713-1720.
- Peña, F. J., O'Flaherty, C., Ortiz Rodríguez, J. M., Martín Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G. L. Gil, M. C., & Ortega Ferrusola, C. (2019). Redox regulation and oxidative stress: The particular case of the stallion spermatozoa. *Antioxidants*, 8(11), 567.
- Peng, T.I., & Jou, M.J. (2010). Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 183-188.
- Pesch, S., & Bergmann, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, 37, 597-612.
- Robertson, L., & Watson, P.F. (1987). The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. *Animal Reproduction Science*, 15, 177-87.
- Romero-Garcia, S., & Prado-Garcia, H. (2019). Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 54, 1155-1167.
- Salih, S.A., Daghigh-Kia, H., Mehdipour, M., & Najafi, A. (2021). Does ergothioneine and thawing temperatures improve rooster semen post-thawed quality?. *Poultry Science*, 100(10), 101405.
- Santulli, G., Xie, W., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2015). Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11389-11394.
- Schuh, K., Cartwright, E. J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J. C., Armesilla, A. L., Emerson, M., Oceandy, D., Knobloch, K. P., & Neyses, L. (2004). Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28220-28226.
- 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.
- Sieme, H, Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20-26.
- Sushadi, P. S., Kuwabara, M., Maung, E. E. W., Mohamad Mohtar, M. S., Sakamoto, K., Selvaraj, V., & Asano, A. (2023). Arresting calcium-regulated sperm metabolic dynamics enables prolonged fertility in poultry liquid semen storage. *Scientific Reports*, 13(1), 21775.
- Treulen, F., Arias, M.E., Aguila, L., Uribe, P., & Felmer, R. (2018). Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. *Cryobiology*, 83, 65-74.

- 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.
- Woelders, H., De Wit, A. A. C., Engel, B., Hulsegge, B., Grasseau, I., Blesbois, E., Bernal, B., & Santiago-Moreno, J. (2022). Freezing chicken semen: Influence of base medium osmolality, cryoprotectants, cryoprotectant concentration, and cooling rate on post-thaw sperm survival. *Cryobiology*, 108, 67-77.
- Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., & Miró, J. (2015). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3(2), 395-407.
- Zampini, R., Castro-González, X. A., Sari, L. M., Martin, A., Diaz, A. V., Argañaraz, M. E., & Apichela, S. A. (2020). Effect of cooling and freezing on llama (*Lama glama*) sperm ultrastructure. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 587596.
- Zhang, P., Chen, Y. P., Qiu, J. H., Dai, Y. Z., & Feng, B. (2019). Imaging the microprocesses in biofilm matrices. *Trends in Biotechnology*, 37(2), 214-226.
- 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.