

## PENGUNAAN NMA DAN LAMA PENYIMPANAN YANG BERBEDA TERHADAP MOTILITAS DAN FERTILITAS SPERMATOZOA AYAM KAMPUNG

Dadang Mulyadi Saleh<sup>\*1</sup> dan Agus Yuniawan Isyanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

<sup>2</sup>Fakultas Pertanian, Universitas Galuh Ciamis

\*Korespondensi email: dadang.saleh@unsoed.ac.id

**Abstrak.** Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui level NMA dan waktu equilibrasi yang baik, ditinjau dari penilaian motilitas dan fertilitas spermatozoa ayam kampung. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan pola factorial 3x2, dengan faktor K= level NMA (K1=5% NMA; K2= 10 % NMA dan K3= 15% NMA) dan faktor W= waktu equilibrasi (W1=60 menit dan W2=180 menit). Gabungan semen dari 10 ekor ayam kampung dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Pengamatan motilitas untuk setiap perlakuan diulang 5 kali, dan fertilitas: setiap perlakuan diinseminasikan @ 10 ekor ayam betina, Isa Brown (n=60). Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh interaksi ( $P>0,05$ ) antara level NMA dan waktu equilibrasi terhadap motilitas dan fertilitas. Rataan motilitas dan fertilitas (%) pada level NMA 5, 10 dan 15 % adalah  $77,5\pm 3,99$ ;  $74,83\pm 3,23$ ;  $73,84\pm 3,34$  ( $P>0,05$ ); dan  $77,85\pm 5,7$ ;  $73,5\pm 3,26$ ;  $68,5\pm 3,24$ ; ( $P>0,05$ ), secara berurutan. Rataan motilitas dan fertilitas (%) pada waktu equilibrasi 1 dan 3 jam adalah:  $77,00\pm 3,57$ ;  $73,80\pm 3,49$ ; ( $P>0,05$ ) dan  $85,17\pm 3,18$ ;  $61,40\pm 4,96$ ; ( $P<0,01$ ), secara berurutan. Kesimpulan berdasarkan penilaian motilitas, penambahan NMA 5-15% layak digunakan dengan waktu equilibrasi hingga 3 jam, sedangkan berdasarkan penilaian fertilitas, penggunaan NMA 5-15 % layak digunakan dengan waktu equilibrasi hanya 1 jam.

**Kata kunci:** NMA, Spermatozoa, ayam kampung, motilitas, fertilitas

**Abstract.** The purpose of this study was to determine the good level of NMA and equilibration time, in terms of the assessment of motility and fertility of Kampung rooster spermatozoa. The study used a completely randomized design with a 3x2 factorial pattern, with a factor of K = NMA level (K1 = 5% NMA; K2 = 10% NMA and K3 = 15% NMA) and factor W = equilibration time (W1 = 60 minutes and W2 = 180 minutes). Pooled semen from 10 Kampung roosters was divided into 6 treatment groups. Observation of motility for each treatment was repeated 5 times, and the fertility: each treatment was inseminated @ 10 commercial laying hens, Isa Brown (n = 60). The analysis showed that there was no interaction effect ( $P> 0.05$ ) between NMA level and equilibration time on motility and fertility. The mean motility and fertility (%) at the NMA of 5, 10 and 15% were  $77.5 \pm 3.99$ ;  $74.83 \pm 3.23$ ;  $73.84 \pm 3.34$  ( $P> 0.05$ ); and  $77.85 \pm 5.7$ ;  $73.5 \pm 3.26$ ;  $68.5 \pm 3.24$ ; ( $P> 0.05$ ), respectively. The mean motility and fertility (%) at equilibration time of 1 and 3 hours were:  $77.00 \pm 3.57$ ;  $73.80 \pm 3.49$ ; ( $P> 0.05$ ) and  $85.17 \pm 3.18$ ;  $61.40 \pm 4.96$ ; ( $P<0.01$ ), respectively. The conclusion is based on the motility assessment, the addition of 5-15% NMA is suitable for use with an equilibration time of up to 3 hours, whereas based on the fertility assessment, the use of NMA 5-15% is suitable for use with an equilibration time of only 1 hour.

**Keywords:** N-Methylacetamide, spermatozoa, rooster, motility, fertility

### PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) pada ayam dengan menggunakan semen cair sudah banyak dilakukan dengan tingkat keberhasilan (fertilitas) yang cukup tinggi, sedangkan IB dengan menggunakan semen beku hasilnya masih belum memuaskan.

Banyak tahapan yang harus dilalui untuk pembekuan semen ayam diantaranya pemilihan pengencer, krioprotektan dan waktu penyimpan krioprotektan (equilibrasi dengan semen). Banyak pengencer ayam yang dijual secara komersial, dan para peneliti sudah membandingkan komposisi dari

berbagai macam pengencer (Saleh DM et al., 2020; Tahseen et al., 2019). Kesimpulannya bahwa belum ada pengencer yang standar dan hasilnya pada fertilitas juga sangat bervariasi.

Pengencer dasar susu skim dan kuning telur yang sudah umum, biasa digunakan dalam pemrosesan semen cair dan beku pada sapi sudah terbukti dapat mempertahankan kualitas semen segar ayam dan mencapai tingkat fertilitas yang tinggi pula (Saleh et al 2020). Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Moreno et al. (2012) dan Abouelezz et al (2015) berpendapat bahwa kuning telur dapat mempertahankan kualitas semen ayam selama pendinginan, pembekuan dan thawing, namun bersifat contraceptive pada saluran reproduksi ayam betina.

Untuk membekukan semen diperlukan krioprotektan. Glycerol sudah berhasil dan sudah umum digunakan pada proses pembekuan semen sapi, kerbau, Domba dan Kambing, namun penggunaan Glycerol bersifat contraceptive pada spermatozoa ayam (Abouellez et al., 2015; 2017).

Banyak penelitian yang menggunakan berbagai macam krioprotektan, namun hasilnya sangat bervariasi pula. Sasaki et al. 2010; C.C. Pérez-Marín, 2019) sudah mencoba menggunakan jenis pengencer yang banyak komposisinya dengan -N-methylacetamide (N-MA) dan sudah terbukti sangat baik digunakan dalam pembekuan semen ayam. Meskipun demikian hingga kini belum ada pembuatan/ penjualan semen beku ayam secara komersial.

Tujuan penelitian ini untuk mengkaji penggunaa level N-methylacetamide (N-MA) 5, 10 dan 15 % pada susu skim+ kuning telur 10 persen dan diequilibrasi 1 dan 3 jam terhadap motilitas dan fertilitas spermatozoa ayam kampung

## **METODE PENELITIAN**

### **Ayam, Penempungan semen dan Evaluasi semen dan telur**

Dua belas ekor ayam kampung jantan, umur 15-18 bulan dan 60 ekor induk ayam petelur dipelihara dalam kandang individu. Semua ternak diberi pakan petelur komersil, jantan sebanyak 130 gr, dan betina 110 gr dan diberi air minum secara ad libitum. Ayam jantan ditampung semennya dengan cara pemijatan dari punggung hingga ke ekor. Semen yang tertampung dikumpulkan dalam satu tabung, kemudian dicampur dengan pengencer susu skim+ 10% kuning telur, ditambah N-MA (5, 10 dan 15 %) dengan ratio semen dan pengencer 1: 2 dan kemudian disimpan selama satu dan tiga jam (sesuai pengelompokkan perlakuan) dalam refrigerator, temperature sekitar 5°C. Perlakuan diulang sebanyak 5 kali, dengan interval penampungan 2 hari. Untuk Inseminasi, tiap perlakuan diinseminasikan (dosis 100 juta spermatozoa/0,1 ml) ke @ 10 ekor ayam betina petelur (Isa Brown).

### **Koleksi data**

Evaluasi semen khususnya motilitas diperoleh dengan memeriksa semen per perlakuan dibawah mikroskop, ditabulasikan kemudian dianalisis. Fertilitas diperoleh dengan memasukkan telur ke dalam mesin tetas (temperature 37°C, kelembaban 60%). Koleksi telur hari ke 2-8 setelah induk ayam diinseminasi tunggal secara intravaginal. Untuk menentukan fertile, telur-telur tersebut dicandling

pada hari ke 7 masa inkubasi. Persentase fertilitas ditentukan dengan menghitung telur yang fertile dibagi dengan total telur yang diinkubasi dalam mesin tetas.

### Analisis statistik

Data dianalisa dengan rancangan complete block design dengan waktu koleksi sebagai blok dan perlakuan disusun dalam 3x2 pola factorial (3 Penambahan N-MA dan 2 Waktu equilibrasi (penyimpanan). Untuk persentase motilitas dan fertilitas dianalisa dengan menggunakan Anova (Steel and Torrie, 1980).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Data rata-rata motilitas hasil pemeriksaan di Laboratorium Fapet Unsoed dan fertilitas spermatozoa ayam kampung dari setiap perlakuan Penambahan NMA (5-10 dan 15%) dalam pengencer susu skim kuning telur 10% yang disimpan selama 1 dan 3 jam pada temperature 5°C tidak menunjukkan pengaruh interaksi;  $P > 0,05$  seperti tertera dalam Tabel 1

Tabel 1. Rataan persentase motilitas dan fertilitas $\pm$ std pada berbagai pengencer+N-MA dan Waktu equilibrasi

Pengencer+NMA	Waktu equilibrasi 1 jam		Waktu equilibrasi 3 jam	
	Motilitas NS	Fertilitas NS	Motilitas NS	Fertilitas NS
Pengencer+ 5% NMA	80,00 $\pm$ 4,23	85,00 $\pm$ 4,71	75,00 $\pm$ 3,78	70,70 $\pm$ 6,70
Pengencer+ 10% NMA	76,33 $\pm$ 2,97	88,50 $\pm$ 2,41	73,67 $\pm$ 3,51	58,50 $\pm$ 4,11
Pengencer+ 15% NMA	74,67 $\pm$ 3,51	82,00 $\pm$ 2,42	73,00 $\pm$ 3,16	55,00 $\pm$ 4,10

<sup>NS</sup> Interaksi berbeda tidak nyata;  $P > 0,05$

### Pengaruh NMA Terhadap Motilitas Dan Fertilitas

#### a. Motilitas spermatozoa

Tabel 2. Rataan persentase motilitas dan fertilitas $\pm$ std pada Pengencer+NMA yang berbeda

Variabel	Pengencer+ NMA (%)		
	5	10	15
Motilitas	77,5 $\pm$ 3,99 <sup>a</sup>	74,83 $\pm$ 3,23 <sup>a</sup>	73,84 $\pm$ 3,34 <sup>a</sup>
Fertilitas	77,85 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	73,5 $\pm$ 3,26 <sup>a</sup>	68,5 $\pm$ 3,245 <sup>a</sup>

Nilai rata-rata $\pm$ std dengan superskrip yang sama, pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata,  $P > 0,05$ .

Rataan persentase motilitas pada 5% NMA, 10 % NMA dan 15% NMA tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ). Hal ini memberikan harapan baik dalam pemrosesan semen ayam ke proses selanjutnya (semen beku). Dalam penelitian ini penggunaan NMA 5 -15 % yang ditambahkan pada pengencer susu skim+kuning telur 10 % memperlihatkan nilai motilitas di atas 70 %. Hasil penelitian Pranay Kumar et al (2018) bahwa Post thawing motility pada ayam yang terbaik diperlihatkan pada penggunaan NMA 6-9 % dengan nilai motilitasnya sekitar  $34,55 \pm 1,06$  %. Mosca et al (2019) menyatakan bahwa PTM terbaik dihasilkan dari penambahan NMA 9 % dibanding NMA 6 %. (24,2 dan 2,8%). Kim et al (2014) mengatakan bahwa penggunaan NMA 7-9% menghasilkan viabilitas sekitar 67 %. Perbedaan hasil dari para peneliti ini kemungkinan karena banyak factor yang

digunakan antar peneliti berbeda, misalnya Jenis pengencer, lama waktu equilibrasi, subjektivitas peneliti dalam menilai motilitas cukup bervariasi. Meskipun demikian hasil dari penelitian ini, berdasarkan penilaian motilitas dari semen segar (belum dibekukan) memperlihatkan bahwa penggunaan NMA 5-15 % perlu ditindak lanjuti.

#### **b. Fertilitas spermatozoa**

Nilai fertilitas diperoleh dari tiap perlakuan yang diinseminasikan @ 10 betina, koleksi telur hari ke 2-8 menunjukkan bahwa Penggunaan NMA 5, 10 dan 15 berbeda tidak nyata ( $P>0,05$ ). Artinya penambahan NMA pada pengencer susu skim+kuning telur 10 persen layak digunakan untuk IB (semen segar). Hasil penelitian Pranay Kumar et al (2018) memperlihatkan bahwa pemberian level NMA 6,9 dan 12 persen pada semen yang dibekukan, menghasilkan fertilitas telur yang sangat rendah (0-5%). Kim et al (2012) melaporkan bahwa Frozen thawed semen dengan NMA 7,5 % menghasilkan fertilitas sekitar 66 persen, sedangkan Kim et al (202) penggunaan NMA 9 % menghasilkan fertilitas sekitar 34,7 persen (dari type ayam jantan yang sama). Hasil penelitian Mosca et al (2019) dengan menggunakan level NMA 6-9% frozen thawed semen menghasilkan fertilitas sekitar 43 persen. Hasil penelitian Kenji et al (2010) penggunaan NMA 9 % frozen thawed semen menghasilkan fertilitas sekitar 83,8 persen. Perbedaan hasil fertilitas ini kemungkinan disebabkan karena perbedaan faktor lainnya, yang digunakan oleh peneliti tidak sama, seperti: jenis pengencer, lama equilibrasi, pengemasan, dosis IB. cara thawing dll.

### **Pengaruh Waktu Equilibrasi Terhadap Motilitas Dan Fertilitas**

#### **a. Waktu equilibrasi terhadap motilitas**

Tabel 3. Rataan persentase motilitas dan fertilitas $\pm$ std pada waktu equilibrasi yang berbeda

Variabel	Waktu equilibrasi (Jam)	
	1	3
Motilitas	77,00 $\pm$ 3,57 <sup>a</sup>	73,80 $\pm$ 3,49 <sup>a</sup>
Fertilitas	85,17 $\pm$ 3,18 <sup>a</sup>	61,40 $\pm$ 4,96 <sup>b</sup>

Nilai rata-ratan $\pm$ std dengan superskrip yang beda, pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata,  $P<0,01$

Penambahan NMA 5, 10 dan 15 % dalam pengencer susu skim+ 10% kuning telur dengan waktu equilibrasi 1 dan 3 jam menunjukkan pengaruh tidak nyata ( $P>0,05$ ) terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung, seperti tertera di Tabel 3. Motilitas spermatozoa sampai 3 jam masih layak untuk diinseminasikan (73,8 %). Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Tahseen et al (2019) bahwa waktu penyimpanan semen dalam pengencer susu skim pada 5°C selama 4 jam masih menghasilkan motilitas individu sekitar 74,3 %. Hal ini diduga spermatozoa mengandung kolesterol, phospholipid dan phospholipid protein yang rendah. Asam lemak mempengaruhi likuiditas membrane. Kolesterol dan asam lemak akan meningkatkan perlindungan pada plasma membrane, menyebabkan membrane menjadi lebih tahan (melindungi) terhadap kerusakan oxidative.

Casein susu menurunkan kerusakan sel membrane lemak dan meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa.

#### ***b. Waktu equilibrasi terhadap fertilitas***

Rataan Fertilitas pada waktu equilibrasi 1 dan 3 jam menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ). Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Kim et al (2014) menyatakan bahwa fertilitas menurun sesuai dengan konsentrasi NMA. Beberapa peneliti juga menyatakan bahwa dalam pembekuan semen ayam menggunakan krioprotektan NMA hasilnya sangat bervariasi, khususnya mengenai konsentrasi optimal NMA dalam melindungi kerusakan spermatozoa ayam (Lee et al., 2012; Abouelezz et al., 2017; Mosca et al., 2016).

#### **KESIMPULAN**

Berdasarkan penilaian motilitas, penambahan NMA 5-15% layak digunakan dengan waktu equilibrasi hingga 3 jam, sedangkan berdasarkan penilaian fertilitas, penggunaan NMA 5-15 % layak digunakan dengan waktu equilibrasi hanya 1 jam.

#### **SARAN**

Penelitian ini perlu dilanjutkan hingga ke proses pembekuan.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Abouelezz, F.M.K., C.Castaño, A.T. Díaza, M.C.Estesoa, A.L. Sebastián, J.L.Campoc and J.S. Moreno. 2015. Sperm–Egg Penetration Assay Assessment of The Contraceptive Effects of Glycerol and Egg Yolk In Rooster Sperm Diluents.
- Abouelezz, F.M.K., M.A.M. Sayed and S. Moreno. 2017. Fertility Disturbances of Dimethylacetamide and Glycerol in Rooster Sperm Diluents: Discrimination Among Effects Produced Pre and Post Freezing-Thawing Process. *Animal Reproduction Science*, 184: 228-234
- Carlos C. Pérez-Marín, Ander Arando, Cristobal Mora, Alejandro Cabello. 2019. Fertility after insemination with frozen-thawed sperm using Nmethylacetamide extender on the Combatiente Español avian breed.
- Kenji Sasaki, Toshiaki Tatsumi, Mariko Tsutsui, Tatsuya Niinomi, Takayuki Imai, Mitsuru Naito, Atsushi Tajima, Yasuhiro Nishi. 2010. A Method for Cryopreserving Semen from Yakido Roosters using N-Methylacetamide as a Cryoprotective Agent. *The Journal of Poultry Science* 47(4), 297-301
- Kim SW., JS Choi, YG Ko, YJ Do, MI Byun, SB Park, HH Seong and Kim CD. 2014. Effect of N-Methylacetamide Concentration on the Fertility and Hatchability of Cryopreserved Ogye Rooster Semen. *Korean Journal of Poultry Science*. Vol 41 (1), 21-27
- Lee H.J, S.K. Kim, H.J. Jang, K.S. Kang, J.H. Kim, S.B. Choi, J.Y. Han. 2012. Cryopreservation of Korean Oge chicken semen using N-methylacetamide. *Cryo Letters*, 33, pp. 427-434
- Moreno, J.S., C. Castaño, A.T. Díaz, M.A. Coloma, A.L. Sebastián, M.T. Prieto and J. L. Campo. 2012. Cryoprotective and Contraceptive Properties of Egg Yolk As An Additive In Rooster Sperm Diluents. *Cryobiology*, 65(3): 230-234.
- Mosca F, L. Zaniboni, A. A. Sayed, M. Madeddu, N. Iaffaldano, and S. Cerolini. 2019. Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *Poultry Science*, pp 6071-6077

- Mosca F, M.Madeddu, A. Abdel Sayed, L. Zaniboni, N. Iaffaldano, S. Cerolini. 2016. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* 73:343-347.
- Pranay Kumar K., B. Swathi, and M. Shanmugam. 2018. Cryopreservation of Rooster Semen using N-Methylacetamide as Cryoprotective Agent. *International Journal of Agriculture Sciences*, ISSN: 0975-3710 & E-ISSN: 0975-9107, Volume 10, Issue 3, pp.-5123-5126
- Sasaki K, T.Tatsumi, M. Tsutsui, T. Niinomi, T. Imai, M. Naito and Y. Nishi. 2010. A Method for Cryopreserving Semen from Yakido Roosters Using N-Methylacetamide as a Cryoprotective Agent. *The Journal of Poultry Science* 47(4), 297-301.
- Saleh DM, M.Y.Sumaryadi, A.P. Nugroho dan C.N. Hidayah. 2020. Prosiding Seminar Teknologi dan Agribisnis Peternakan VII–Webinar: Prospek Peternakan di Era Normal Baru Pasca Pandemi COVID-19, Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, 27 Juni 2020, ISBN: 978-602-52203-2-6
- Tahseen. A. AL- Saeedi, Ali A. I. AL-Juaifari and Abbas H. J. Al-mahmoudi. 2019. The Effect of Different Extenders on Some Fertility Properties of Roosters Semen. *International Journal of Poultry Science*, 18: 504-507.