

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pemeriksaan Kualitas Spermatozoa Ayam Kedu Merah

5.1.1. Semen Segar Ayam Kedu Merah

Pemeriksaan dan evaluasi semen segar ayam kedu Merah meliputi pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis merupakan pengamatan yang dilakukan secara visual tanpa bantuan alat mikroskop, sedangkan pengamatan mikroskopis adalah pengamatan menggunakan bantuan alat yaitu mikroskop. Hasil pemeriksaan semen segar dari 10 ekor ayam kedu merah disajikan pada Tabel 5.1.1

Tabel 5.1.1. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar 10 ekor ayam kedu merah

Pemeriksaan	Hasil	Standart	Referensi
Mikroskopis			
Volume (ml/ejakulasi)	2,5	0,2 - 0,5	(Garner and Hafez, 2008)
pH	7	6,4 - 7,8	(Peters <i>et al.</i> , 2008)
Viskositas	Kental	Tinggi/Kental	(Putranto, 2020)
Warna	Putih Krem	Putih Krem	(Ax <i>et al.</i> , 2008)
Bau	Khas	Khas	(Junaedi <i>et al.</i> , 2017)
Mikroskopis			
Konsentrasi (sel/mm ³) x 10 ⁶	4840	3 -7 M	(Garner and Hafez, 2008)
Motilitas Massa (%)	+++	++/+++	(Toelihere, 1993)
Motilitas Individu (%)	85	>70	(Toelihere, 1993)
Abnormalitas	7,5	10 - 15	(Garner and Hafez, 2008)
Viabilitas (%)	91,5	>85	(Toelihere, 1993)
Integritas MPU (%)	85,5	>30	(Bebas and Laksmi, 2015)

Keterangan : MPU = Membran plasma utuh, (-) = buruk; (+) = sedang; (++) = baik; (+++) = sangat baik

Volume semen ayam kedu merah rata-rata 0.25 ml/ekor/ejakulasi. Hasil yang didapatkan normal dan sesuai dengan pernyataan Garner and Hafez (2008) bahwa ayam lokal pada umumnya memiliki volume rata-rata antara 0.2 - 0.5 ml. Derajat keasaman atau pH diukur menggunakan kertas indikator pH BTB. Derajat keasaman atau pH diukur menggunakan kertas indikator pH BTB. Semen ayam kedu merah dalam penelitian ini menghasilkan pH yaitu 7, menunjukkan pH tersebut normal. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Yendraliza *et al.* (2015) bahwa pH normal semen segar pada ayam berkisar antara 7,2 - 7,6. Derajat keasaman (pH) semen dipengaruhi adanya proses metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerobik berupa asam laktat, semakin tinggi atau semakin rendah

pH semen akan menyebabkan spermatozoa lebih cepat mengalami kematian.

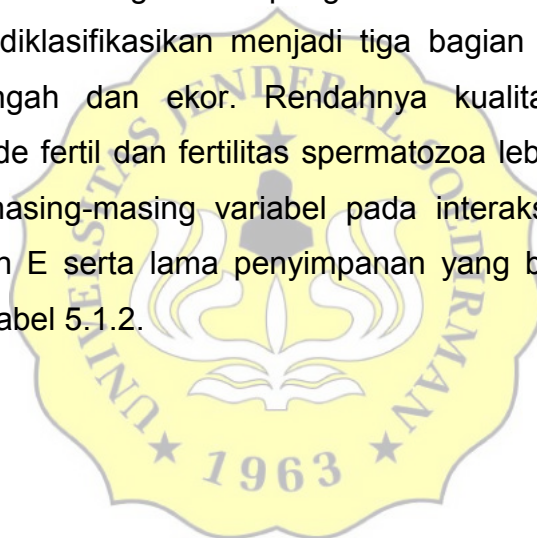
Viskositas semen ayam kedu merah kental menunjukkan bahwa semen tersebut normal. Menurut Putranto *et al.* (2020) konsentrasi spermatozoa dapat ditentukan berdasarkan warna dan kekentalan, semen dengan konsentrasi rendah umumnya memiliki viskositas encer dan warna bening sebaliknya semen dengan konsentrasi tinggi memiliki viskositas kental dan warna putih pekat. Warna pada semen ayam kedu merah menunjukkan putih krem. Hal tersebut normal dan sesuai dengan pernyataan Ax *et al.* (2008) bahwa semen yang baik adalah berwarna putih krem. Semen yang memiliki campuran warna lain mengindikasikan bahwa semen telah terkontaminasi (Kusumawati *et al.*, 2020). Bau pada semen ayam kedu merah menghasilkan bau khas hal tersebut normal. Triardi *et al.* (2022) menyatakan bahwa semen memiliki bau khas seperti bau amis khas sperma disertai dengan bau hewan itu sendiri.

Konsentrasi spermatozoa ayam kedu merah rata-rata $4.840 \text{ (sel/mm}^3\text{)} \times 10^6$, masih dalam kisaran normal dan sesuai dengan pendapat Garner and Hafez (2008) bahwa semen ayam mengandung 3 - 7 milyar/ml. Motilitas massa spermatozoa ayam kedu merah menunjukkan nilai +++ artinya bergerak progresif. Persentase motilitas yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 85%. Hal tersebut lebih tinggi dari penelitian Hidayat *et al.* (2020) yaitu $83,75 \pm 25$. Nilai motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa *adenosine triphosphate* (ATP) hasil metabolisme (Danang *et al.*, 2012).

Viabilitas spermatozoa ayam kedu merah rata-rata 91,5%. Persentase daya hidup spermatozoa dipengaruhi lama penyimpanan karena semakin berkurang juga jumlah energi dalam pengencer (Haq *et al.*, 2020). Presentase abnormalitas semen ayam kedu merah dalam penelitian ini yaitu 7,5%, hasil tersebut normal dan dapat digunakan untuk inseminasi buatan sesuai dengan pernyataan Nugroho and Saleh (2016) menyatakan bahwa abnormalitas untuk syarat inseminasi buatan tidak lebih dari 20%. Pemeriksaan integritas membran plasma utuh yang dilakukan menggunakan larutan hipoosmotik dengan teknik *hypoosmotic swelling test* (HOST) pada semen ayam kedu merah menunjukkan hasil sebesar 85,5%. Hasil tersebut lebih tinggi dari hasil integritas MPU pada ayam hutan dalam penelitian Bebas and Laksmi (2015) dengan metode yang sama yaitu menghasilkan $30,00 \pm 1,00$.

5.1.2. Interaksi Jenis Pengencer, Dosis Vitamin E dan Waktu Penyimpanan Berbeda terhadap Kualitas Spermatozoa

Pemeriksaan motilitas merupakan parameter utama yang menunjukkan kemampuan spermatozoa membuahi ovum pada saat fertilitas (Bakst and Dyamond, 2013; Moradpour, 2019). Spermatozoa yang mengalami kerusakan membran plasma ditandai dengan ekor yang lurus sedangkan spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar atau menggembung (Karja *et al.* 2017). Viabilitas spermatozoa adalah salah satu indikator untuk menguji spermatozoa yang hidup dengan membran yang masih utuh. Viabilitas spermatozoa dinilai dengan memeriksa motilitas dan rasio hidup/mati (Barth and Oko, 1989). Penilaian abnormalitas sperma penting bagi analisis semen karena sangat mempengaruhi kualitas semen. Abnormalitas spermatozoa dapat diklasifikasikan menjadi tiga bagian yaitu abnormalitas pada kepala, bagian tengah dan ekor. Rendahnya kualitas mikroskopis akan menyebabkan periode fertil dan fertilitas spermatozoa lebih singkat. Rataan hasil dan analisis dari masing-masing variabel pada interaksi jenis pengencer dan penambahan vitamin E serta lama penyimpanan yang berbeda pada suhu 4°C dapat dilihat dalam tabel 5.1.2.



Tabel 5.1.2. Rataan nilai dan simpangan baku interaksi antara jenis pengencer, dosis vitamin E dan waktu simpan terhadap motilitas, integritas MPU, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ayam kedu merah pada suhu 4°C

Perlakuan	Motilitas ^{ns}	MPU ^{ns}	Viabilitas ^{ns}	Abnormalitas ^{ns}
P ₁ V ₀ W ₀	80,33 ± 5,13	82,83 ± 5,62	92,33 ± 2,52	9,17 ± 2,02
P ₁ V ₀ W ₁	79,33 ± 1,15	80,83 ± 11,43	92,50 ± 1,32	10,83 ± 1,61
P ₁ V ₀ W ₂	81,33 ± 1,15	83,50 ± 6,38	93 ± 2	6,17 ± 3,33
P ₁ V ₀ W ₃	81,33 ± 0,58	83,5 ± 11,69	90,17 ± 1,26	8,67 ± 3,51
P ₁ V ₁ W ₀	82,83 ± 2,93	83,67 ± 14,77	91,33 ± 1,53	9,67 ± 2,02
P ₁ V ₁ W ₁	80,33 ± 1,53	81,33 ± 9,65	90,50 ± 1,32	9,67 ± 1,53
P ₁ V ₁ W ₂	83 ± 2,65	82,83 ± 8,02	91,50 ± 0,50	8 ± 4,77
P ₁ V ₁ W ₃	82,67 ± 2,52	84,33 ± 9,52	90,17 ± 1,89	9,50 ± 3,28
P ₁ V ₂ W ₀	80,33 ± 2,31	81 ± 4,58	91,33 ± 0,29	10,17 ± 2,75
P ₁ V ₂ W ₁	81 ± 1	82,17 ± 15,37	91,83 ± 0,29	12,17 ± 2,02
P ₁ V ₂ W ₂	84,33 ± 2,08	86,17 ± 12,89	93,67 ± 1,53	9,17 ± 2,75
P ₁ V ₂ W ₃	82 ± 1,73	83,50 ± 20,20	91,50 ± 1,50	11 ± 1
P ₁ V ₃ W ₀	81,67 ± 3,06	84,33 ± 14,68	93,33 ± 1,53	10 ± 2
P ₁ V ₃ W ₁	82,50 ± 2,29	85,33 ± 19,02	94 ± 1,73	11 ± 1,50
P ₁ V ₃ W ₂	82,33 ± 2,08	83,83 ± 5,48	94,17 ± 1,26	6,83 ± 2,02
P ₁ V ₃ W ₃	82 ± 1	84,83 ± 3,18	92,6 ± 0,66	7,50 ± 1,32
P ₂ V ₀ W ₀	81,83 ± 4,54	82,17 ± 18,10	92,17 ± 1,61	10,33 ± 1,76
P ₂ V ₀ W ₁	79 ± 2	80,83 ± 15,91	91,83 ± 1,76	9 ± 1,80
P ₂ V ₀ W ₂	81,67 ± 1,53	82,50 ± 17,51	92 ± 2	7 ± 2,65
P ₂ V ₀ W ₃	80,33 ± 0,58	81,50 ± 34,83	91,83 ± 0,76	8,83 ± 2,75
P ₂ V ₁ W ₀	81,83 ± 2,75	82,83 ± 10,28	92,33 ± 1,53	10,67 ± 3,21
P ₂ V ₁ W ₁	81 ± 2	81,33 ± 6,60	90,83 ± 1,76	11,33 ± 2,25
P ₂ V ₁ W ₂	82 ± 0	82,67 ± 5,53	91,83 ± 0,29	8 ± 2,65
P ₂ V ₁ W ₃	81,67 ± 2,52	82 ± 10,58	90,17 ± 1,26	9,50 ± 3,28
P ₂ V ₂ W ₀	80 ± 0	81,50 ± 14,31	90,83 ± 0,76	15,50 ± 1,32
P ₂ V ₂ W ₁	79,67 ± 1,15	80 ± 18,03	89,67 ± 0,76	15,17 ± 2,02
P ₂ V ₂ W ₂	82,17 ± 0,29	84,83 ± 8,40	92,17 ± 0,29	9,83 ± 2,36
P ₂ V ₂ W ₃	81,33 ± 1,53	83,33 ± 15,78	91,67 ± 1,53	12,67 ± 1,44
P ₂ V ₃ W ₀	79 ± 1	80,17 ± 15,89	90 ± 1,32	9,50 ± 1,80
P ₂ V ₃ W ₁	79 ± 1	80,17 ± 15,02	89,50 ± 0,50	9,50 ± 0,50
P ₂ V ₃ W ₂	80,67 ± 0,58	82,67 ± 6,53	92,17 ± 0,29	6,33 ± 2,08
P ₂ V ₃ W ₃	80,33 ± 1,53	82,33 ± 8,02	90,50 ± 1,32	8,17 ± 2,02
<i>P Value</i>	0,937	0,979	0,821	0,323

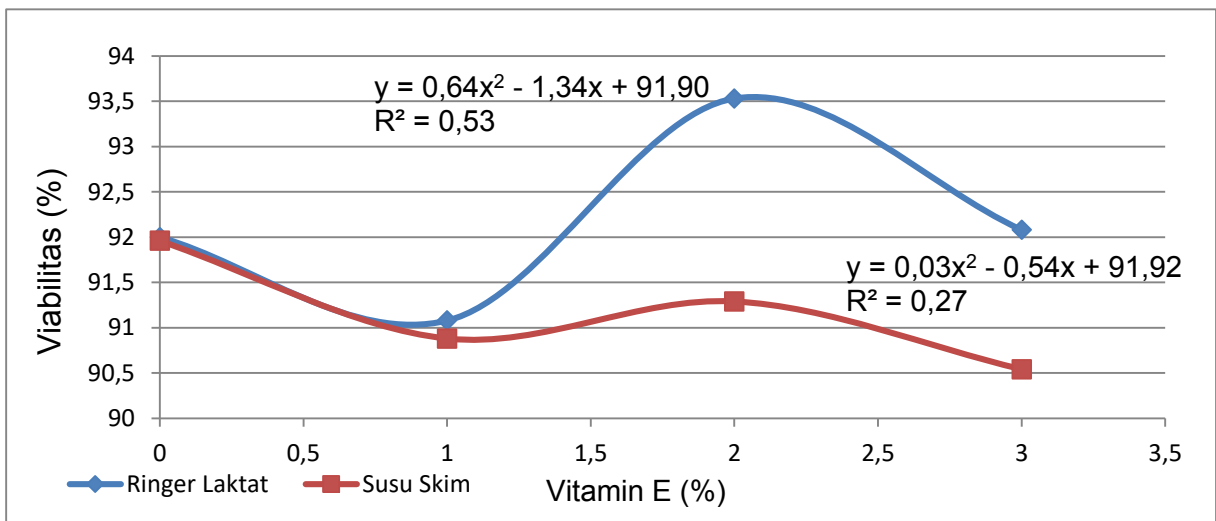
Keterangan : MPU = Membran plasma utuh, P₁ = Ringer laktat, P₂ = Susu skim + 50 mM glukosa 50, V₀ = 0% vitamin E, V₁ = 1% Vitamin E, V₂ = 2% vitamin E, V₃ = 3% Vitamin E, W₀ = 0 jam, W₁ = 2 jam, W₂ = 4 jam, W₃ = 6 jam penyimpanan; Kolom sig. dengan tanda (ns) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

Berdasarkan Tabel 5.1.2. Interaksi antara bahan pengencer, dosis vitamin E dan lama penyimpanan berpengaruh tidak nyata (P>0,05) terhadap motilitas, integritas membran plasma, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa. Rataan motilitas spermatozoa akibat kombinasi perlakuan yaitu 79 - 84,33%, integritas

membran plasma utuh yaitu 80 - 86,17%, viabilitas sebesar 89,5 - 94,17%, dan rataan abnormalitas yakni 6,17 - 15,17%. Hal ini menunjukkan semen yang dimasukkan di dalam pengencer ringer laktat atau susu skim + 50 mM glukosa dan ditambah vitamin E menghasilkan respon yang sama antar kombinasi perlakuan.

5.1.3. Interaksi Jenis Pengencer dan Dosis Vitamin E terhadap Kualitas Spermatozoa

Hasil analisis variansi menunjukkan interaksi jenis pengencer dan dosis vitamin E berpengaruh tidak nyata ($P > 0.05$) terhadap motilitas dan integritas membran plasma utuh, namun berbeda sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap viabilitas dan abnormalitas spermatozoa. Kombinasi pengencer ringer laktat dengan vitamin E 2% menghasilkan viabilitas yang paling tinggi, sebesar $93,53 \pm 1,32\%$ (Gambar 1).



Gambar 5.1. Grafik interaksi jenis pengencer dan dosis vitamin E terhadap viabilitas spermatozoa ayam kedu merah

Berdasarkan uji orthogonal polynomial pada gambar 5.1. diperoleh persamaan pada pengencer ringer laktat $y = 0,64x^2 - 1,34x + 91,90$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 53% yang artinya setiap 0,1% vitamin E pada pengencer ringer laktat akan meningkatkan viabilitas sebesar 0,53% dan pada pengencer susu skim + 50 mM glukosa $y = 0,03x^2 - 0,54x + 91,92$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 27% yang artinya setiap 0,1% vitamin E dalam pengencer susu skim + 50 mM glukosa akan meningkatkan viabilitas sebesar 0,27%.

Gambar 5.1. menunjukkan bahwa penambahan vitamin E pada pengencer ringer laktat dan susu skim + 50 mM glukosa sama-sama terjadi tren penurunan viabilitas pada penambahan vitamin E lebih dari 2%. Hal ini dikarenakan kandungan

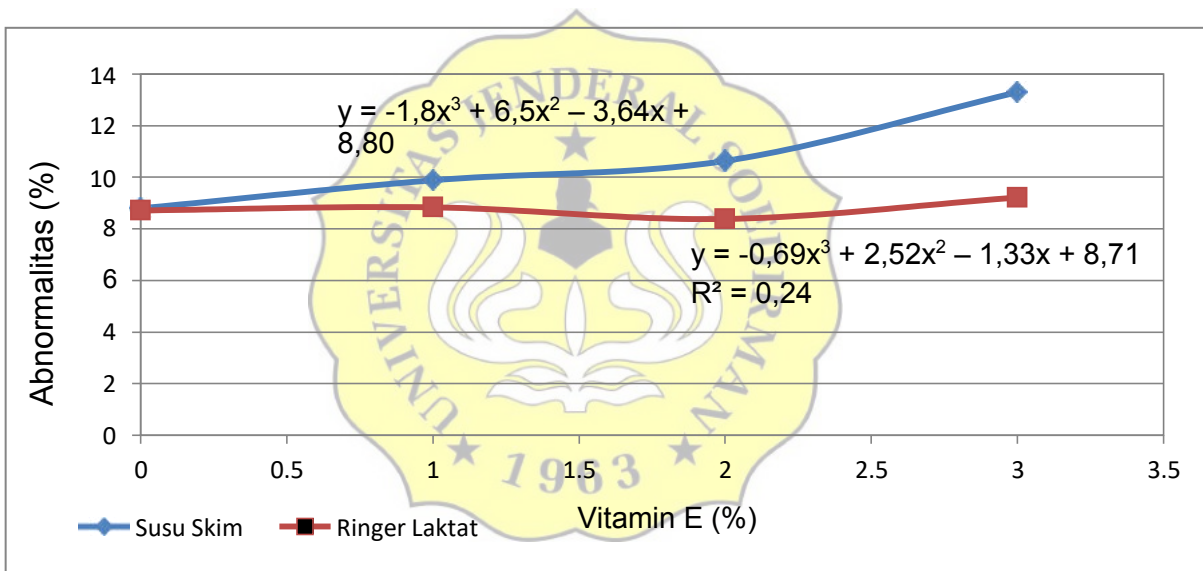
gizi yang terlalu tinggi yaitu laktosa pada susu skim dan adanya penambahan glukosa dalam pengencer dapat menyebabkan penurunan metabolisme sperma yang tinggi pada saat penyimpanan suhu dingin (Clarke *et al.*, 1982). Penambahan glukosa 50 mM dalam pengencer susu skim diduga menyebabkan penurunan viabilitas karena penambahan senyawa krioprotektan ekstraseluler dalam jumlah banyak dapat mengakibatkan meningkatnya tekanan osmotik larutan pengencer dan kurang dapat diadaptasi dengan baik oleh spermatozoa sehingga berakibat buruk terhadap berlangsungnya proses metabolisme spermatozoa (Mayesta *et al.*, 2014). Hal ini akan mengganggu berlangsungnya proses-proses biokimia secara normal di dalam sel, yang pada akhirnya akan menurunkan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan suhu 4°C.

Pengencer ringer laktat lebih baik dari pada pengencer susu skim + 50 mM glukosa dalam mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa, karena merupakan larutan yang sifatnya mendekati plasma semen. Fitriyah *et al.* (2019) menjelaskan larutan ringer laktat merupakan larutan yang terdiri dari berbagai macam garam mineral yaitu *sodium lactate*, *sodium chloride*, *pottasium chloride*, *calcium chloride*, osmolaritas, Na⁺, K⁺, *lactate* dan kandungan *sodium chloride* yang sama dengan unsur-unsur elektrolit dari plasma semen ayam itu sendiri seperti natrium, clorida, kalsium dan magnesium yang memiliki daya penyangga (buffer) dan isotonik yang dapat mendukung viabilitas spermatozoa dalam waktu penyimpanan yang lebih lama, sedangkan susu skim memiliki kandungan yaitu protein, karbohidrat, kalium, vitamin A, B₁, B₂, B₃, dan B₆ yang kurang dapat mendukung daya tahan spermatozoa. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Danang *et al.* (2012) bahwa pengencer ringer laktat mengandung Na-laktat untuk mempertahankan keasaman larutan dan tekanan osmotik larutan.

Vitamin E pada konsentrasi 2% merupakan konsentrasi yang optimal untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa. Hal ini diduga karena pada konsentrasi 2% vitamin E mampu mengoptimalkan kemampuannya sebagai antioksidan untuk melindungi sperma dari radikal bebas selama proses penyimpanan. Namun penambahan konsentrasi vitamin E lebih dari 2% akan menurunkan nilai viabilitas spermatozoa. Hal ini dikarenakan alfa tokoferol mempunyai sifat basa apabila tidak ada oksigen. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Ansgarius *et al.* (2022) bahwa vitamin E bersifat basa dengan kandungan antioksidan dalam jumlah banyak dapat bersifat peroksidan sehingga akan

mengakibatkan penurunan motilitas. Menurut Gordon (1990) besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi, dan menambahkan pada konsentrasi tinggi akan mengakibatkan aktivitas antioksidan akan lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi peroksidan.

Kombinasi jenis pengencer dan vitamin E yang efektif mempertahankan abnormalitas spermatozoa adalah ringer laktat dengan 2% vitamin E, dengan nilai 8,38%. Hasil uji *orthogonal polynomial* pada gambar 5.2 diperoleh persamaan pada pengencer susu skim + 50 mM glukosa $y = -1,8x^3 + 6,5x^2 - 3,64x + 8,80$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 60% yang artinya setiap 0,1% vitamin akan menurunkan abnormalitas sebesar 0,60% dan pada pengencer ringer laktat $y = -0,69x^3 + 2,52x^2 - 1,33x + 8,71$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 24% yang artinya setiap 0,1% vitamin akan menurunkan abnormalitas sebesar 0,24%.



Gambar 5.2. Grafik Interaksi antara jenis pengencer dan dosis vitamin E terhadap abnormalitas spermatozoa ayam kedu merah

Berdasarkan gambar 5.2. menunjukkan bahwa pada pengencer susu skim + 50 mM glukosa terjadi tren peningkatan pada penambahan 0-3% vitamin E, sedangkan pada pengencer ringer laktat terjadi tren sama dengan pengencer susu skim + 50 mM glukosa namun peningkatannya tidak terlalu tinggi dan nilai abnormalitas menurun pada penambahan vitamin E 2% kemudian meningkat pada vitamin E 3%. Semakin tinggi nilai abnormalitas maka kualitas spermatozoa semakin buruk. Penambahan vitamin E pada pengencer ringer laktat lebih baik dari pada pengencer susu skim + 50 mM glukosa dalam mencegah kerusakan spermatozoa.

Kerusakan membran plasma sel spermatozoa yang diakibatkan oleh adanya protein pengikat (binder) dalam semen ayam, yang mana protein plasma semen adalah komponen utama plasma semen yang berinteraksi dengan protein susu, interaksi ini penting untuk perlindungan spermatozoa (Khaeruddin *et al.*, 2020). Bahan pengencer ringer laktat dan susu skim + 50 mM glukosa yang digunakan pada penelitian ini cukup baik dalam menjaga keutuhan spermatozoa karena susu skim mengandung laktosa yang berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa sedangkan ringer laktat merupakan larutan yang tekanan osmosisnya hampir sama dengan tekanan osmosis semen ayam dan zat antioksidan yaitu vitamin E yang membantu mempertahankan pH semen selama penyimpanan. Hasil penelitian ini hampir sama dengan laporan penelitian Nugroho and Saleh (2016) bahwa penggunaan pengencer ringer laktat menghasilkan abnormalitas spermatozoa ayam kampung sebesar 8,50% selama satu jam penyimpanan.

5.1.4. Pengaruh Jenis Pengencer dan Waktu Simpan terhadap Kualitas Spermatozoa

Hasil analisis variansi menunjukkan interaksi jenis pengencer dan waktu penyimpanan, serta interaksi antara dosis vitamin E dan waktu penyimpanan berpengaruh tidak nyata ($P > 0.05$) terhadap motilitas, integritas membran plasma utuh, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa. Rataan hasil dan analisis dari masing-masing variabel pada interaksi jenis pengencer dan waktu penyimpanan dapat dilihat dalam tabel 5.1.4, sedangkan interaksi dosis vitamin E dan waktu penyimpanan dapat dilihat dalam tabel 5.1.5.

Tabel 5.1.4. Rataan nilai dan simpangan baku interaksi jenis pengencer dan waktu penyimpanan terhadap motilitas, integritas MPU, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ayam kedu merah pada suhu 4°C

Perlakuan	Motilitas ^{ns}	MPU ^{ns}	Viabilitas ^{ns}	Abnormalitas ^{ns}
P ₁ W ₀	81,29 ± 1,34	82,96 ± 20,02	92,08 ± 1,35	9,75 ± 2,42
P ₁ W ₁	80,79 ± 1,34	83,67 ± 3,18	92,21 ± 1,61	10,92 ± 2,24
P ₁ W ₂	82,75 ± 2,52	84,67 ± 13,82	93,08 ± 1,32	7,54 ± 1,32
P ₁ W ₃	82 ± 1,73	84,29 ± 10,79	91,11 ± 1,50	9,17 ± 2,02
P ₂ W ₀	80,67 ± 0,58	82,17 ± 13,01	91,33 ± 1,44	11,50 ± 2,25
P ₂ W ₁	79,67 ± 1,15	80,33 ± 6,60	90,46 ± 1,32	11,25 ± 1
P ₂ W ₂	81,63 ± 1,58	84,83 ± 8,85	92,04 ± 1,74	7,79 ± 2,65
P ₂ W ₃	80,92 ± 2,88	82,54 ± 15,78	91,04 ± 1,28	9,79 ± 2,42
<i>P Value</i>	0,965	0.511	0.207	0,297

Keterangan: MPU = Membran plasma utuh, P₁ = Ringer laktat, P₂ = Susu skim + 50 mM glukosa 50, W₀ = 0 jam, W₁ = 2 jam, W₂ = 4 jam, W₃ = 6 jam penyimpanan; Kolom sig. dengan tanda (ns) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

Tabel 5.1.5. Rataan nilai dan simpangan baku interaksi dosis vitamin E dan waktu penyimpanan terhadap motilitas, integritas MPU, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ayam kedu merah pada suhu 4°C

Perlakuan	Motilitas ^{ns}	MPU ^{ns}	Viabilitas ^{ns}	Abnormalitas ^{ns}
V ₀ W ₀	81,08 ± 2,23	82 ± 8,02	92,25 ± 1,32	9,75 ± 2,36
V ₀ W ₁	79,17 ± 2	80,83 ± 10,35	92,17 ± 1,61	9,92 ± 3,04
V ₀ W ₂	81,5 ± 3,06	82,5 ± 17,51	92,5 ± 1,32	6,58 ± 2,08
V ₀ W ₃	80,84 ± 4,54	82 ± 13,84	91 ± 1,5	8,75 ± 3,51
V ₁ W ₀	82,34 ± 2,08	83,75 ± 21,62	91,83 ± 1,65	10,17 ± 2,75
V ₁ W ₁	80,67 ± 0,58	81,83 ± 10,94	90,67 ± 1,32	10,5 ± 3,21
V ₁ W ₂	82,5 ± 2,29	84,25 ± 17,51	91,67 ± 1,53	8 ± 2,65
V ₁ W ₃	82,17 ± 2,08	83,17 ± 9,52	90,17 ± 1,89	9,5 ± 0,5
V ₂ W ₀	80,17 ± 1,77	82,25 ± 15,89	91,08 ± 1,76	12,83 ± 2,85
V ₂ W ₁	80,33 ± 2,31	81,58 ± 12,85	90,75 ± 1,33	13,67 ± 2,02
V ₂ W ₂	83,25 ± 2,39	84,5 ± 15,02	92,92 ± 0,66	9,5 ± 3,28
V ₂ W ₃	81,67 ± 1,15	82,42 ± 5,48	91,58 ± 0,5	11,83 ± 2,85
V ₃ W ₀	80,34 ± 2,31	81,25 ± 12,38	91,67 ± 0,29	9,75 ± 2,36
V ₃ W ₁	80,75 ± 1,82	82,75 ± 4,58	91,75 ± 1,61	10,25 ± 2,75
V ₃ W ₂	81,5 ± 1,15	83,25 ± 10,79	93,17 ± 1,53	6,58 ± 2,08
V ₃ W ₃	81,17 ± 1,53	83,08 ± 12,65	91,55 ± 0,5	7,83 ± 1,32
<i>P Value</i>	0,713	0,813	0,493	0,930

Keterangan : MPU = Membran plasma utuh, V₀ = 0% vitamin E, V₁ = 1% Vitamin E, V₂ = 2% vitamin E, V₃ = 3% Vitamin E, W₀ = 0 jam, W₁ = 2 jam, W₂ = 4 jam, W₃ = 6 jam penyimpanan; Kolom sig. dengan tanda (ns) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

Pengaruh interaksi yang tidak nyata terhadap kualitas spermatozoa dimungkinkan karena kombinasi perlakuan hanya memberikan pengaruh masing-masing tapi tidak memberikan pengaruh bersama terhadap kualitas spermatozoa. Pengaruh masing-masing perlakuan (faktor) ditunjukkan pada Tabel 5.1.6. Jenis

pengencer berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa. Motilitas yang dihasilkan pengencer ringer laktat lebih tinggi dari pengencer susu skim + 50 mM glukosa sebesar $81,71 \pm 2,29^a$ %, sedangkan pengencer susu skim + 50 mM glukosa menghasilkan motilitas sebesar $80,72 \pm 1,82^b$ % (Tabel 5.1.6). Ringer laktat memiliki elektrolit yang hampir sama dengan plasma semen sehingga spermatozoa dapat bergerak bebas seperti pada lingkungan aslinya dibanding dengan susu skim yang memiliki partikel lemak yang dapat mengganggu pergerakan spermatozoa. Ringer laktat mengandung sumber air dan elektrolit, menghasilkan efek alkalinisasi metabolik, dan mengandung sejumlah senyawa kimia, air, nilai pH, osmolaritas, dan sumber energi (Telnoni *et al.*, 2021). Ringer laktat adalah salah satu bahan pengencer fisiologis, Na-Laktat pada ringer laktat diperlukan untuk memenuhi kebutuhan ion bikarbonat yang berfungsi untuk mempertahankan keasaman larutan atau sebagai penyangga larutan serta mempertahankan tekanan osmotik larutan. Larutan ringer laktat juga terdapat kandungan glukosa yang merupakan energi pengganti fruktosa dalam plasma semen yang diperlukan untuk aktivitas metabolisme selama penyimpanan semen (Pandia *et al.*, 2021). Hasil penelitian ini lebih tinggi sedikit dari hasil penelitian Azzam *et al.* (2022) dengan motilitas sebesar $80,20 \pm 1,30\%$ menggunakan pengencer ringer laktat dengan waktu penyimpanan 2 jam, hal yang membedakan adalah adanya perbedaan strain ayam dan penambahan 10% kuning telur dalam pengencer ringer. Menurut Telnoni *et al.* (2021) ringer laktat mengandung sumber air dan elektrolit, menghasilkan efek alkalinisasi metabolik, dan mengandung sejumlah senyawa kimia, air, nilai pH, osmolaritas, dan sumber energi yang diperlukan untuk aktivitas metabolisme selama penyimpanan semen. Motilitas yang dihasilkan dengan pengencer susu skim + glukosa 50 mM sebesar $80,72 \pm 1,82^b$ %. Hasil penelitian ini lebih rendah dari laporan Saleh *et al.* (2022) yaitu menghasilkan motilitas sebesar $82 \pm 2,74\%$ menggunakan pengencer susu skim. Hal yang membedakan adalah strain ayam dan lama penyimpanan yaitu semen selama 1 jam. Menurut Chakraborty and Saha (2022) yang menjelaskan bahwa semen harus memiliki nilai motilitas 80% untuk keperluan IB. Motilitas spermatozoa yang tinggi memberikan peluang pembuahan yang lebih tinggi karena hanya spermatozoa yang motil yang dapat membuahi sel telur. Arah pergerakan spermatozoa ke depan (motilitas progresif) merupakan kriteria utama kualitas semen.

Penambahan vitamin E dengan konsentrasi berbeda berpengaruh tidak nyata ($P>0.05$) terhadap motilitas spermatozoa, dengan nilai $81,21 \pm 0,55\%$. Hasil penelitian ini lebih baik dari laporan Amaefule *et al.* (2020) yaitu menghasilkan nilai motilitas sebesar $77,15 \pm 5,81\%$ dengan penambahan vitamin E 125 mg. Menurut Chakraborty and Saha (2022) bahwa semen harus memiliki nilai motilitas 80% untuk keperluan inseminasi buatan. Motilitas spermatozoa yang tinggi memberikan peluang pembuahan yang lebih tinggi karena hanya spermatozoa yang motil yang dapat membuahi sel telur. Arah pergerakan spermatozoa ke depan (motilitas progresif) merupakan kriteria utama kualitas semen.

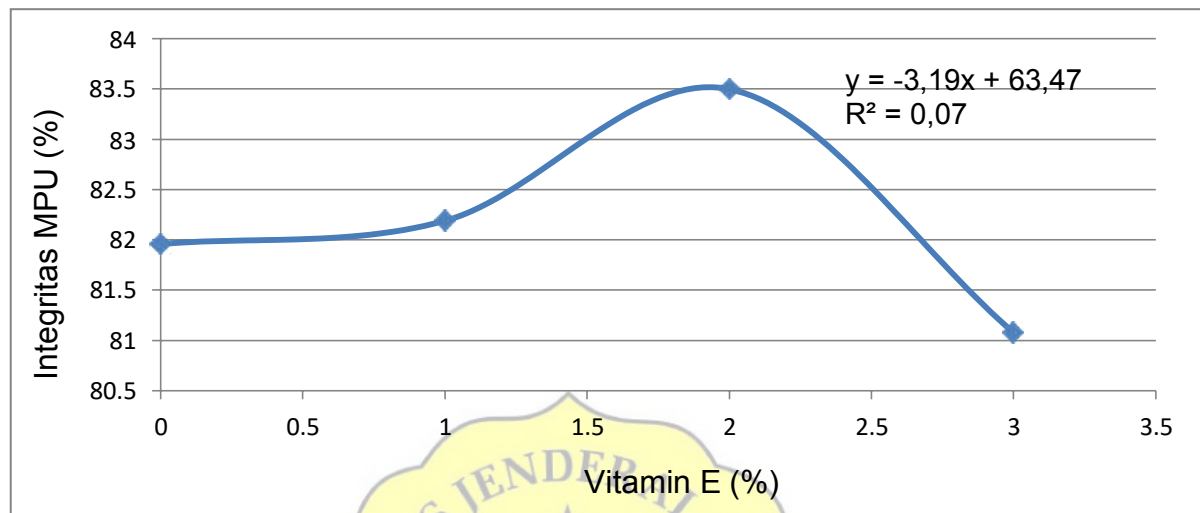
Tabel 5.1.6. Rataan nilai dan simpangan baku pengaruh jenis pengencer, dosis vitamin E dan waktu simpan terhadap motilitas dan integritas MPU spermatozoa ayam kedu merah pada suhu 4°C

Faktor Perlakuan	Motilitas	MPU	Viabilitas	Abnormalitas	Fertilitas	Periode Fertil
P ₁	81,71 ± 2,29 ^a	81,69 ± 12,85	92,12 ± 1,74 ^a	9,34 ± 2,62 ^a	55,59	8,42
P ₂	80,72 ± 1,82 ^b	82,68 ± 13,82	91,22 ± 1,41 ^b	10,08 ± 3,04 ^b	64,02	10,58
<i>P Value</i>	0,017	0,118	0,002	0,02		
V ₀	80,65 ± 2,44	81,96 ± 16,18 ^{bc}	91,98 ± 1,65	9,75 ± 2,57 ^{bc}	54,30	10,42
V ₁	81,35 ± 1,89	82,19 ± 13,84 ^{ab}	91,08 ± 1,37	9,54 ± 2,58 ^b	-	-
V ₂	81,92 ± 2	83,50 ± 8,85 ^a	92,03 ± 2	8,60 ± 2,14 ^a	65,31	8,58
V ₃	80,94 ± 1,99	81,08 ± 11,93 ^c	91,58 ± 1,38	11,96 ± 2,85 ^c	-	-
<i>P Value</i>	0,145	0,02	0,069	0,001		
W ₀	80,98 ± 2,88 ^{bc}	82,07 ± 12,65	91,71 ± 1,61 ^b	10,63 ± 2,66 ^b	68,43	12,08
W ₁	81,46 ± 1,44 ^{ab}	81 ± 14,45	91,33 ± 1,81 ^b	9,48 ± 2,44 ^a	-	-
W ₂	82,19 ± 1,69 ^a	83,25 ± 10,94	92,56 ± 1,38 ^a	7,67 ± 2,76 ^a	51,18	6,92
W ₃	80,23 ± 1,77 ^c	83,22 ± 15,42	91,08 ± 1,43 ^b	11,08 ± 2,36 ^c	-	-
<i>P Value</i>	0,01	0,439	0,002	0,004		

Keterangan: P₁ = Ringer laktat, P₂ = Susu skim + 50 mM glukosa, V₀ = 0% vitamin E, V₁ = 1% Vitamin E, V₂ = 2% vitamin E, V₃ = 3% Vitamin E, W₀ = 0 jam, W₁ = 2 jam, W₂ = 4 jam, W₃ = 6 jam penyimpanan; Kolom sig. dengan tanda (**) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P<0,01$), tanda (*) menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$), dan tanda (ns) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0,05$); Angka yang diikuti superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$)

Penambahan vitamin E berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap membran plasma utuh spermatozoa. Hasil uji *orthogonal polynomial* pada gambar 5.3. diperoleh persamaan linier pada $y = -3,19x + 63,47$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,7% yang artinya setiap 0,1% vitamin akan menurunkan abnormalitas sebesar 0,07%. Penambahan konsentrasi vitamin E yang semakin besar akan menurunkan nilai dari membran plasma utuh. Masrifah *et al.* (2017) menjelaskan bahwa penambahan vitamin E pada konsentrasi tinggi mengakibatkan aktivitas

antioksidan lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi pro-oksidan atau toksik. Menurut Dorota and Kurpirsz (2004) bahwa oksidasi fosforilasi yang terganggu menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) semen. Kadar ROS yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) yang mana lipid membran plasma semen sangat rentan terhadap ROS.



Gambar 5.3. Grafik pengaruh penambahan vitamin E terhadap integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa ayam kedu merah

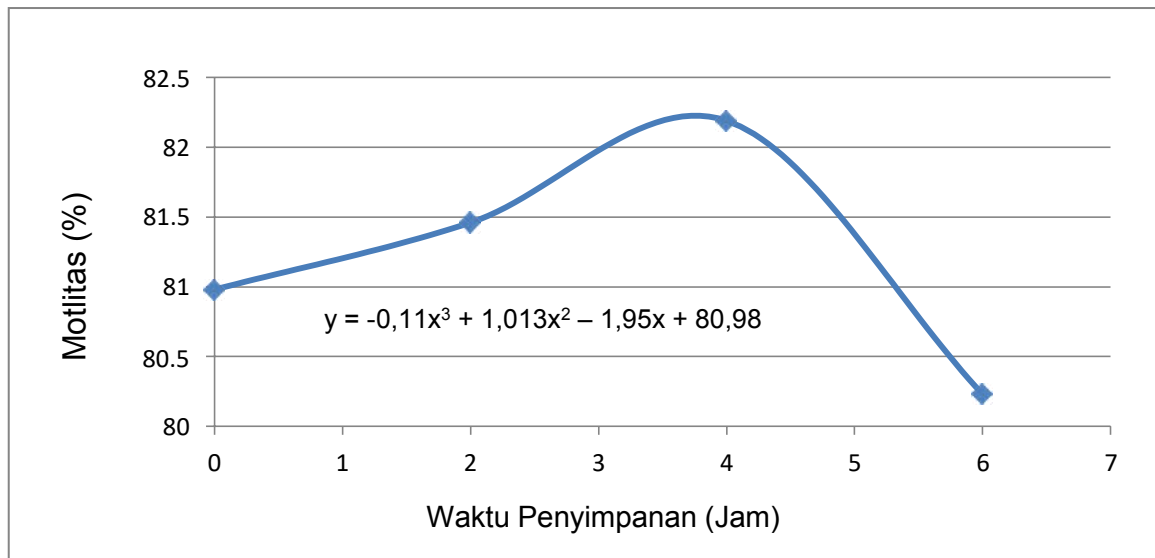
Hasil penelitian ini lebih rendah dari laporan penelitian Farid *et al.* (2021) yaitu menghasilkan nilai integritas MPU sebesar $88,50 \pm 1,73$ dengan penambahan $5 \mu\text{g/ml}$ vitamin E selama 1 jam penyimpanan. Hal yang menjadi pembeda yaitu konsentrasi vitamin E yang digunakan. Menurut Tabatabaei *et al.* (2011) membran plasma sperma mengandung asam lemak tak jenuh dalam jumlah tinggi, sehingga rentan terhadap kerusakan peroksidatif yang ditunjukkan dengan hilangnya integritas membran selanjutnya dan kegagalan fungsi sel sperma akan menurunkan motilitas spermatozoa.

Dalam proses metabolisme spermatozoa akan dihasilkan radikal bebas berupa turunan oksigen, termasuk oksigen tunggal (O_2), triplet oksigen (3O_2), anion superoksida (O^{-2}), radikal hidroksil (OH) dan oksida nitrat (NO^-) yang semuanya disebut spesies oksigen reaktif (ROS). Oksigen tunggal dapat merusak ikatan rangkap pada asam lemak yang dapat merusak asam deoksiribonukleat (DNA) dan protein (Devi *et al.*, 2000). Menurut Dorota and Kurpirsz (2004) bahwa oksidasi fosforilasi dalam metabolisme sel spermatozoa yang terganggu menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) semen. Kadar ROS yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) yang

mana lipid membran plasma semen sangat rentan terhadap ROS.

Radikal bebas akan mengambil elektron dari asam lemak tak jenuh yang menyusun fosfolipid membran plasma, sehingga terjadi reaksi peroksida. Efek fosfolipid peroksida pada spermatozoa unggas antara lain merusak morfologi spermatozoa, menurunkan motilitas dan menyebabkan rendahnya fertilitas (Long and Kramer, 2003). Vitamin E berperan dalam lapisan fosfolipid membran sel dan berfungsi melindungi asam lemak tak jenuh ganda dan komponen membran sel lainnya dari oksidasi radikal bebas dengan cara memutus rantai lipid peroksida. Vitamin E berperan dengan mendonorkan ion hidrogen untuk menetralkan atau menurunkan kadar lemak peroksida (Hariyatmi, 2004).

Hasil analisis variansi pada faktor waktu simpan berpengaruh sangat nyata ($P > 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa. Menghasilkan nilai terbaik sebesar $82,19 \pm 1,69^a$ % pada penyimpanan 4 jam. Kemudian dilakukan uji lanjut *orthogonal polynomial* pada gambar 5.4 mendapatkan hasil kubik diperoleh persamaan $y = -0,11x^3 + 1,013x^2 - 1,95x + 80,98$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 11% yang artinya setiap 1 jam akan menurunkan motilitas sebesar 0,11%. Berdasarkan Gambar 5.4 menunjukkan bahwa adanya peningkatan motilitas sampai pada waktu 4 jam dan terjadi penurunan setelah penyimpanan 6 jam. Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan penelitian Farid *et al.* (2021) dengan penambahan vitamin E sebanyak 5 $\mu\text{g/ml}$ pada semen ayam KUB terjadi penurunan motilitas diikuti semakin lama waktu simpan ditunjukkan hasil T1 (2 jam) = $90,75 \pm 1,708$, T2 (4 jam) = $85,50 \pm 4,203$, T3 (8 jam) = $83,50 \pm 2,88$, T4 (48 jam) = $76,25 \pm 5,058$, hal tersebut diduga berkaitan dengan cadangan energi berupa ATP pada saat penyimpanan yang sudah mulai berkurang. Hal tersebut didukung oleh pendapat Yaman *et al.* (2021) bahwa semakin lama waktu simpan maka semakin rendah motilitas spermatozoa akibat *cold stress*, ketidakseimbangan osmotik dan adanya asam laktat akibat metabolime anaerobik.



Gambar 5.4. Grafik pengaruh waktu penyimpanan terhadap motilitas individu spermatozoa ayam kedu merah

5.2. Fertilitas dan Periode Fertil

Ukuran keberhasilan program IB adalah fertilitas telur dari ayam betina (Bakst and Dyamond, 2013). Fertilitas tergantung pada kualitas dan kuantitas spermatozoa yang dideposisikan (Brillard, 2003). Penentuan fertilitas telur melalui candling pada hari ke-7 inkubasi. Fertilitas telur dihitung dari total telur yang fertil di bagi dengan total telur yang diinkubasi dikalikan 100% (Modupe *et al.*, 2013).

Tabel 5.2.1. Rataan nilai dan simpangan baku kombinasi perlakuan terhadap fertilitas dan periode fertl

Perlakuan	Fertilitas (%)**	Periode Fertl (Hari)*
P ₁ V ₀ W ₀	50,70 ± 28,05 ^{ab}	10,67 ± 3,06 ^{ab}
P ₂ V ₂ W ₀	93,63 ± 5,53 ^a	11,67 ± 1,53 ^{ab}
P ₁ V ₂ W ₀	58,90 ± 8,40 ^{ab}	11,33 ± 2,08 ^{ab}
P ₂ V ₀ W ₀	70,50 ± 26,19 ^{ab}	14,67 ± 0,58 ^a
P ₁ V ₀ W ₂	30,53 ± 4,79 ^b	7,67 ± 6,11 ^{ab}
P ₂ V ₂ W ₂	26,50 ± 9,69 ^b	7,33 ± 2,52 ^{ab}
P ₁ V ₂ W ₂	82,23 ± 16,76 ^a	4 ± 1 ^b
P ₂ V ₀ W ₂	65,47 ± 6,64 ^{ab}	8,67 ± 4,93 ^{ab}
<i>P Value</i>	0,001	0,032

Keterangan: P₁ = Ringer laktat, P₂ = Susu skim + 50 mM glukosa 50, V₀ = 0% vitamin E, V₂ = 2% vitamin E, W₀ = 0 jam penyimpanan, W₂ = 4 jam penyimpanan; Kolom sig. dengan tanda (**) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01), tanda (*) menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05); Angka yang diikuti superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada BNJ (P<0,05)

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01) terhadap fertilitas. Rataan fertilitas tertinggi diperoleh nilai 93,63 ± 5,53^b % pada perlakuan P₂V₂W₀. Dalam hal ini pengencer susu skim + 50 mM glukosa

dalam kombinasinya dengan 2% vitamin E selama 0 jam penyimpanan menghasilkan nilai fertilitas yang terbaik, dibandingkan dengan pengencer ringer laktat. Hal tersebut dikarenakan susu skim mengandung laktosa sebagai sumber makanan yang digunakan spermatozoa untuk menghasilkan ATP. Hoesni (2016) menyatakan bahwa penggunaan susu skim sebagai pengencer berfungsi sebagai pelindung spermatozoa dari pengaruh kejut dingin sekaligus sumber makanan bagi spermatozoa karena kandungan lipoprotein dan lesitin yang bekerja pada selubung lipoprotein sel sperma yang melindunginya dari kejut dingin. Glukosa dalam larutan pengencer bertindak sebagai krioprotektan, mempertahankan tekanan osmosis larutan pengencer dan sebagai sumber energi bagi spermatozoa selama penyimpanan.

Vitamin E dengan konsentrasi 2% bekerja secara optimal sebagai antioksidan untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh radikal bebas sehingga dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Menurut Putra *et al.* (2019) menyatakan bahwa vitamin E merupakan salah satu antioksidan yang digunakan untuk menghambat reaksi peroksidasi lipid, yakni suatu zat yang dapat mengikat senyawa radikal bebas dengan cara memindahkan hidrogen fenolat pada radikal bebas dari asam lemak tidak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi. Hasil penelitian ini lebih tinggi dari laporan Saleh *et al.* (2022) yaitu sebesar $90,0 \pm 1,41\%$ menggunakan pengencer susu skim + glukosa 50 mM pada semen ayam kampung. Hasil fertilitas pada penelitian ini tergolong tinggi didukung dengan pendapat Mohan *et al.* (2018) bahwa persentase fertilitas hasil inseminasi buatan pada unggas umumnya berkisar 73-87%.

Waktu penyimpanan 0 jam merupakan waktu yang terbaik untuk meningkatkan fertilitas, berbeda dengan penyimpanan 4 jam menghasilkan nilai fertilitas yang lebih rendah. Hal tersebut berkaitan dengan cadangan energi berupa ATP pada saat penyimpanan yang sudah mulai berkurang. Hal tersebut didukung oleh pendapat Yaman *et al.* (2021) bahwa semakin lama waktu simpan maka semakin rendah motilitas spermatozoa akibat *cold stress*, ketidakseimbangan osmotik dan adanya asam laktat akibat metabolime anaerobik.

Selama proses penyimpanan pada suhu 4°C spermatozoa secara cepat kehilangan daya motilitasnya dan terjadi banyak penghambatan terhadap aktivitas terhadap aktivitas metabolisme secara fisik dan kimia dengan ditandai penurunan

metabolisme adenosin trifosfat dan adenosin 3,5 monofosfat (Apell and Evans, 1997). Angka keasaman merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi daya hidup spermatozoa, sehingga berpengaruh terhadap motilitas dan daya fertilitas (Susilawati and Hernawati, 1992). Hal ini sesuai dengan pendapat Telnoni *et al.* (2021) menyatakan bahwa rendahnya persentase fertilitas disebabkan kegagalan spermatozoa untuk mencapai dan memasuki tempat penyimpanan sperma, kemampuan mencapai tempat fertilisasi pada infundibulum, menembus lapisan perivitelin ovum dan kegagalan spermatozoa membentuk pronukleus yang menyebabkan tidak terjadi pembuahan.

Metode deposisi semen yang digunakan yaitu intra vagina, artinya pendeposisian sperma disuntikan ke dalam daerah perbatasan antara vagina dengan ke dalaman \pm 3-4 cm. Sperma akan dipindahkan ke tempat utama sperma di *sperm storage tubules* (SST). Sperma akan keluar dari SST dan diangkut ke infidibulum sebagai tempat pembuahan dan berfungsi sebagai tempat penyimpanan sperma kedua. Ovum yang telah dibuahi akan dipindahkan ke magnum sebagai tempat sekresi albumin, dan berlanjut ke isthmus sebagai tempat pembentukan membran cangkang dan pembentukan cangkang telur hingga terovulasi. Ayam membutuhkan waktu 24-26 jam untuk pembentukan folikel (folikel pertama) dan akan mengalami ovulasi (Bakst and Dymond, 2013).

Rataan periode fertil tertinggi diperoleh nilai $14,67 \pm 0,58^a$ hari pada kombinasi perlakuan $P_2V_0W_0$, dan rata-rata terendah diperoleh nilai 4 ± 1^b hari pada $P_1V_2W_2$ (Tabel 5.2.1). Pengencer susu skim + 50 mM glukosa tanpa penambahan vitamin E yang disimpan selama 4 jam menghasilkan nilai periode fertil yang terbaik. Hal ini dikarenakan susu skim dengan glukosa mempunyai kandungan gizi yang tinggi diantaranya laktosa, protein, karbohidrat, kalium, vitamin A, B₁, B₂, B₃, dan B₆ yang berfungsi untuk sumber makanan bagi spermatozoa sehingga daya tahan hidup spermatozoa tetap terjaga dalam waktu yang lebih lama dibanding dengan pengencer ringer laktat. Hasil penelitian ini lebih rendah dari hasil penelitian Mariani and Kartika (2018) bahwa lama periode fertil pada ayam didapatkan rata-rata 15 hari.

Penambahan konsentrasi 0% vitamin E menghasilkan nilai periode fertil yang lebih lama dibanding adanya penambahan vitamin E. Hal itu diduga karena dalam penambahan vitamin E sebagai antioksidan yang mencegah radikal bebas pada pengencer akan lebih mempertahankan nilai motilitas spermatozoa dibandingkan

dengan tanpa penambahan vitamin E yang membuat gerak spermatozoa lebih lambat sehingga akan menyebabkan proses metabolisme lambat juga. hal tersebut sejalan dengan laporan Hidayat *et al.* (2019) yaitu fertilitas terendah dihasilkan pada perlakuan pemberian 80 µg/ml vitamin E pada itik Magelang sebesar $6,3 \pm 3,4$ hari dan tertinggi pada kelompok itik Mojosari tanpa vitamin E sebesar $19,5 \pm 0,6$. Hidayat *et al.* (2019) menjelaskan bahwa rendahnya periode fertil akibat penambahan vitamin E disebabkan oleh berkurangnya sumber energi dan semakin tingginya endapan asam laktat akibat motilitas spermatozoa yang tinggi sehingga pH akan turun sehingga spermatozoa akan cepat mati. Spermatozoa bergerak dengan memanfaatkan energi dari metabolisme dan produk sampingan dari metabolisme tersebut adalah asam laktat. Asam laktat bersifat racun sehingga merusak fungsi enzim dalam proses metabolisme asam laktat juga menurunkan pH yang akan merusak membran sel spermatozoa. Semakin tinggi laju metabolisme spermatozoa akan menurunkan substrat tersedia dalam pengecer sebagai sumber energi dan meningkatkan asam laktat. Penambahan vitamin E akan memperpendek periode fertil karena spermatozoa tidak dapat bertahan lebih lama di tempat penyimpanan spermatozoa betina yang akan dibawa ke infidibulum sebagai tempat pembuahan dan berfungsi sebagai tempat penyimpanan sperma kedua dalam sistem reproduksi ayam betina.

Waktu penyimpanan 0 jam merupakan waktu yang optimal untuk menghasilkan periode fertil yang panjang berbeda dengan penyimpanan 4 jam yang mana menghasilkan nilai periode fertil yang lebih cepat. Hal tersebut berkaitan dengan cadangan energi berupa ATP pada saat penyimpanan yang sudah mulai berkurang. Hal tersebut didukung oleh pendapat Yaman *et al.* (2021) bahwa semakin lama waktu simpan maka semakin rendah motilitas spermatozoa akibat *cold stress*, ketidakseimbangan osmotik dan adanya asam laktat akibat metabolisme anaerobik.

Faktor yang membatasi periode fertil adalah ketersediaan spermatozoa setelah berada dalam saluran reproduksi dan pengurangan jumlah spermatozoa yang cukup drastis selama periode bertelur. Spermatozoa yang telah disimpan didalam *Utero Vaginal Junction* (UVJ), dilepaskan secara bertahap atau sedikit demi sedikit dalam lumen uterus. Pelepasan spermatozoa ini terjadi sekitar waktu ovulasi dan oviposisi. Segera setelah spermatozoa dilepas, aktivitas metabolisme dan motilitas spermatozoa meningkat, dan diduga setelah terjadi proses penurunan

stabilitas plasmalema sehingga daya hidup spermatozoa semakin menurun. Lamanya kemampuan hidup spermatozoa ayam dalam saluran reproduksi betina mencapai 32 hari, akan tetapi daya fertilitasnya hanya mencapai 21 hari setelah inseminasi (Kismiati, 1999).

