

## STUDI MORFOMETRIK DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA ENAM RUMPUN AYAM LOKAL INDONESIA

*(Study of Sperm Morphometric and Morphology of Six Indonesian Local Chicken Breeds)*

**Khaeruddin<sup>1\*</sup>, Hermawansyah<sup>1</sup>, Bahri Syamsuryadi<sup>1</sup>, Junaedi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai

<sup>2</sup>Bagian Peternakan, Fakultas Pertanian Perikanan dan Peternakan, Universitas Sembilan Belas November

\*Korespondensi e-mail : Erukhaeruddin@gmail.com

### ABSTRACT

*This study aims to determine the morphometric comparison and identify abnormal sperm morphology in six types of Indonesian local chickens. Sperm observed came from six types of local chickens: red jungle fowl, Sentul chicken, Gaga' chicken, Kampung Unggul Balitnak (KUB) chicken, Arab Silver chicken, and Bangkok chicken. Semen was collected by sequencing technique, then fresh semen was blotted on glass slides with eosin-nigrosine dye. Morphometrics and morphology of sperm were observed using a light microscope with a magnification of 100x16. ImageJ software was used for sperm morphometric observation on 60 sperm cells, while morphological observations were carried out by counting normal and abnormal sperm on 200 sperm cells. The results showed that there were variations in the size of sperm among the six types of chickens. Red jungle fowl had a higher total length and tail length than Sentul, Gaga', KUB, Arab, and Bangkok chickens. Observation of morphological characteristics showed that sperm with the highest abnormal morphology were in red jungle fowl and gaga' chickens. Tail bending and mid-piece bending is the most common abnormalities found in Indonesian local chickens.*

**Keywords:** *Morphometric; morphology; sperm; Indonesian local chicken*

### PENDAHULUAN

Teknologi reproduksi seperti inseminasi buatan (IB) dan kriopreservasi semen dapat membantu melestarikan dan menyebarkan spesies hewan langka. Selain itu, teknologi IB dapat digunakan untuk meningkatkan mutu genetik ternak dan mempercepat perbanyak populasi ternak.

Indonesia memiliki beragam jenis ternak lokal yang perlu mendapatkan perhatian serius dalam peningkatan mutu genetik dan peningkatan populasinya, salah satunya adalah ayam lokal. Menurut Rosita *et al.* (2020) di Indonesia terdapat berbagai jenis ayam lokal, baik asli maupun hasil adaptasi yang dilakukan

puluhan bahkan ratusan tahun yang lalu. Upaya perbaikan mutu genetik ayam lokal melalui program IB masih sangat jarang digunakan di Indonesia.

Kualitas spermatozoa menjadi faktor penting dalam mencapai keberhasilan IB, sehingga diperlukan upaya penilaian (evaluasi) spermatozoa di laboratorium sebelum dinyatakan layak untuk diinseminasi ke ayam betina. Morfologi spermatozoa adalah salah satu karakteristik kualitatif yang paling penting untuk dinilai dari semen unggas (Łukaszewicz *et al.*, 2008). Morfologi spermatozoa abnormal berhubungan dengan rendahnya motilitas dan fertilitas ayam (Feyisa *et al.*, 2018). Jenis dan strain ayam adalah salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas spermatozoa (Haunshi *et al.*, 2011; Shanmugam *et al.*, 2012). Hasil penelitian Feyisa *et al.* (2018) menyatakan bahwa persentase spermatozoa hidup normal dan abnormal bervariasi antar breed ayam. Beberapa laporan menunjukkan persentase abnormalitas spermatozoa ayam lokal Indonesia yang cukup rendah yaitu 2.5-3% (Ervandi, 2017), 2.99-3.62% (Hambu *et al.*, 2016) dan 9-17.03% (Almahdi *et al.*, 2014).

Data morfometrik spermatozoa berbagai jenis ayam lokal Indonesia masih sangat kurang, saat ini hanya pernah dilaporkan oleh Ardhani *et al.* (2018) pada ayam nunukan. Padahal data morfometrik juga berhubungan dengan fertilitas pada unggas.

Menurut Garcia-Herreros (2016) morfometrik kepala spermatozoa adalah salah satu faktor yang digunakan dalam penilaian fertilitas pada unggas, dan berpotensi untuk digunakan dalam proses seleksi ayam pejantan untuk program IB. Perbedaan ukuran kepala spermatozoa kemungkinan mempengaruhi kecepatan pergerakannya. Hal ini berdasarkan pendapat Santiago-Moreno *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa spermatozoa burung *partridge* dengan kepala yang lebih panjang memiliki pergerakan yang lebih cepat. Selain itu, morfometrik spermatozoa dilaporkan berhubungan dengan daya hidup spermatozoa selama pembekuan. Ukuran kepala spermatozoa mempengaruhi volume air yang dibawa oleh sel, serta permeabilitas membran sel terhadap air dan krioprotektan, pada gilirannya mempengaruhi tingkat kelangsungan hidup sel (Esteso *et al.*, 2003; Esteso *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2005).

Morfometrik spermatozoa bervariasi pada berbagai spesies unggas (Santiago-Moreno *et al.*, 2016). Wysokińska dan Kondracki (2019) menyatakan bahwa ada efek heterosis yang nyata pada ukuran dan bentuk kepala spermatozoa. berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan morfometrik dan mengidentifikasi morfologi spermatozoa abnormal pada enam jenis ayam lokal Indonesia.

## MATERI DAN METODE

Spermatozoa yang diamati berasal dari enam jenis ayam lokal yaitu ayam hutan merah, ayam Sentul, ayam Gaga', ayam kampung unggul balitnak (KUB), ayam Arab *Silver* dan ayam Bangkok dengan umur masing-masing lebih dari 1 tahun.

Semen ayam dikoleksi dengan teknik pemijatan (masase) pada bagian kloaka, semen ditampung dengan spuit tuberculin. Semen segar yang diperoleh selanjutnya diwarnai dengan mencampurkan setetes semen dengan setetes eosin-nigrosin (Merck, Germany). Campuran tersebut dihomogenkan dan diulas pada kaca preparat, selanjutnya dihangatkan di atas *heating table*.

Spermatozoa pada preparat ulas diamati menggunakan mikroskop cahaya (Boeco, Germany)

dengan perbesaran 100x16. Dilakukan pengambilan gambar pada lensa okuler mikroskop menggunakan kamera. Pengamatan morfometrik dilakukan dengan menggunakan software *ImageJ* terhadap 60 sel spermatozoa, sedangkan pengamatan morfologi dilakukan dengan menghitung spermatozoa normal dan abnormal terhadap 200 sel spermatozoa. Klasifikasi morfologi abnormal spermatozoa berdasarkan Alkan *et al.* (2002).

Rancangan yang digunakan untuk studi morfometrik spermatozoa yaitu rancangan acak kelompok dengan enam perlakuan (jenis ayam) dan 60 kali ulangan (sel spermatozoa). Sedangkan morfologi spermatozoa diamati secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Morfometrik Spermatozoa

Kepala spermatozoa ayam berbentuk silinder (filiform), akrosom terletak pada bagian anterior dengan persentase 12-19% dari panjang kepala (Gambar 1). Menurut Santiago-Moreno *et al.* (2016), spermatozoa filiform adalah produk dari proses rumit yang melibatkan urutan kronologis interaksi seluler yang dimodulasi oleh hormon endokrin, autokrin, dan parakrin, sitokin, dan faktor pertumbuhan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa panjang spermatozoa cukup bervariasi di antara enam jenis ayam (Tabel 1). Ayam Gaga' memiliki spermatozoa yang paling pendek ( $47.34 \pm 0.28 \mu\text{m}$ ) diikuti oleh ayam Arab ( $85.30 \mu\text{m}$ ), ayam Sentul dan KUB ( $91.62-92.30 \mu\text{m}$ ), kemudian ayam Bangkok ( $94.40 \mu\text{m}$ ) dan ayam hutan merah memiliki ukuran spermatozoa yang paling panjang ( $98.87 \mu\text{m}$ ). Hasil ini hampir sama dengan yang didapatkan Andrazek *et al.* (2018) yaitu  $92,27 \mu\text{m}$  pada ayam

strain Ross, dan 94,72  $\mu\text{m}$  pada ayam nunukan (Ardhani *et al.*, 2018). Hal ini menunjukkan bahwa panjang spermatozoa dipengaruhi oleh faktor genetik, sesuai dengan pendapat

Maroto-Morales *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa karakteristik morfometri spermatozoa diatur secara genetik.

Tabel 1. Morfometrik spermatozoa enam rumpun ayam lokal Indonesia

Parameter	Hutan merah	Sentul	Gaga'	KUB	Arab Silver	Bangkok
	..... $\mu\text{m}$ .....					
Panjang total	98.87 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	91.62 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	47.34 $\pm$ 0.28 <sup>e</sup>	92.30 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>	85.30 $\pm$ 0.47 <sup>d</sup>	94.40 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
Panjang kepala	12.60 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>	14.84 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	13.52 $\pm$ 0.13 <sup>cd</sup>	13.64 $\pm$ 0.13 <sup>bc</sup>	13.04 $\pm$ 0.10 <sup>de</sup>	14.11 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
Panjang mid-piece	4.15 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	3.78 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	4.46 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	4.34 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	3.34 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	3.54 $\pm$ 0.07 <sup>bc</sup>
Panjang ekor	82.09 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	73.01 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>	29.35 $\pm$ 0.29 <sup>e</sup>	74.32 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>	68.90 $\pm$ 0.46 <sup>d</sup>	76.75 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>
Lebar kepala	1.23 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	1.17 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.05 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.91 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
Panjang akrosom	2.18 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.91 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	2.09 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.72 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	1.90 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>	1.82 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>

Selain itu, Briskie *et al.* (1997) menyatakan bahwa panjang spermatozoa burung berkorelasi positif dengan panjang tubulus penyimpan spermatozoa pada saluran reproduksi betina. Senada dengan pendapat Immler *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa ukuran sarang spermatozoa pada saluran reproduksi betina telah disarankan mempengaruhi ukuran spermatozoa pada beberapa spesies burung pegas (*pheasant*). Sedangkan beberapa penulis melaporkan bahwa spesies hewan jantan yang betinanya bersifat polyandrous (dikawini lebih dari satu jantan) memiliki ukuran spermatozoa yang lebih panjang dan bergerak lebih cepat dari spesies dengan hewan betina seksual monogami (Birkhead,

2000; Briskie *et al.*, 1997; Kleven *et al.*, 2009).

Ayam Sentul memiliki spermatozoa dengan ukuran kepala terpanjang yaitu 14.84  $\mu\text{m}$ , sedangkan ayam hutan merah dan ayam arab memiliki spermatozoa dengan ukuran kepala terpendek yaitu 12.60- 13.04  $\mu\text{m}$ . Sedangkan kepala spermatozoa ayam gaga' dan ayam hutan merah paling lebar di antara ayam lainnya yaitu 1.17- 1.23  $\mu\text{m}$ . Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya pada jenis ayam lainnya. Ardhani *et al.* (2018) menemukan panjang kepala spermatozoa ayam nunukan yaitu 12.76  $\mu\text{m}$ . Santiago-Moreno *et al.* (2016) menyatakan bahwa panjang kepala spermatozoa pada unggas berkisar 11 hingga 21  $\mu\text{m}$ .

Sedangkan Garcia-Herreros (2016) melaporkan data yang sedikit berbeda bahwa panjang kepala spermatozoa *Gallus gallus* adalah 10.48  $\mu\text{m}$  dan lebar 1.39  $\mu\text{m}$ . Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa panjang kepala spermatozoa ayam dipengaruhi faktor genetik. Sejalan dengan penelitian Vidal dan Colominas (2007) yang menyatakan bahwa panjang dan luas kepala spermatozoa ditemukan lebih kecil pada burung *partridge* berkaki merah murni jika dibandingkan panjang dan luas kepala spermatozoa hasil silangannya.

Panjang bagian tengah (*mid-piece*) spermatozoa ayam hutan merah, KUB dan Gaga' yaitu 4.15-4.46  $\mu\text{m}$  lebih tinggi dari panjang *mid-piece* spermatozoa ayam bangkok, arab silver dan sentul. Ayam hutan merah memiliki spermatozoa dengan ekor terpanjang yaitu 82.09  $\mu\text{m}$  sedangkan ayam gaga' memiliki spermatozoa berekor paling pendek yaitu 29.35  $\mu\text{m}$ . Panjang akrosom relatif hampir sama di antara rumpun ayam kecuali ayam hutan merah yang memiliki ukuran akrosom terpanjang yaitu 2.18  $\mu\text{m}$ . Hasil ini hampir sama dengan penelitian Ardhani *et al.*, (2018) bahwa spermatozoa ayam nunukan memiliki panjang *mid-piece* 4.22  $\mu\text{m}$ , panjang ekor 75.74  $\mu\text{m}$ , bahkan panjang akrosom spermatozoa ayam nunukan tersebut 1.91  $\mu\text{m}$  sama dengan

panjang akrosom spermatozoa ayam sentul pada penelitian ini. Demikian juga panjang akrosom 1.92  $\mu\text{m}$  ditemukan pada spermatozoa ayam strain Ross, panjang *mid-piece* 3.36  $\mu\text{m}$  dan panjang ekor 75.86  $\mu\text{m}$  (Andrazek *et al.*, 2018). Perbedaan morfometrik spermatozoa dari berbagai penelitian dapat disebabkan oleh bahan pewarnaan spermatozoa (Andrazek *et al.*, 2018; Santiago-Moreno *et al.*, 2016; Villaverde-Morcillo *et al.*, 2015).

### Morfologi Spermatozoa

Morfologi abnormal spermatozoa ayam lokal cukup bervariasi (Tabel 2). Abnormalitas spermatozoa pada ayam hutan merah dan ayam gaga' cukup tinggi yaitu masing-masing 29% dan 28.5% dengan didominasi oleh ekor bengkok. Hasil ini sangat berbeda dengan penelitian sebelumnya bahwa abnormalitas spermatozoa ayam hutan merah India hanya 8.1% (Rakha *et al.*, 2015) dan ayam gaga' 2.5% (Ervandi, 2017). Ekor membengkok merupakan bentuk abnormalitas utama pada ayam hutan merah dan ayam gaga' abnormalitas spermatozoa yang merupakan abnormalitas sekunder. Feyisa *et al.* (2018) menyatakan bahwa sebagian besar kelainan spermatozoa ayam ditemukan terjadi di bagian ekor diikuti oleh kepala, ekor spermatozoa yang cacat menurunkan motilitas,

fertilitas, dan daya tetas karena mempengaruhi kemampuan spermatozoa untuk mencapai dan menembus telur.

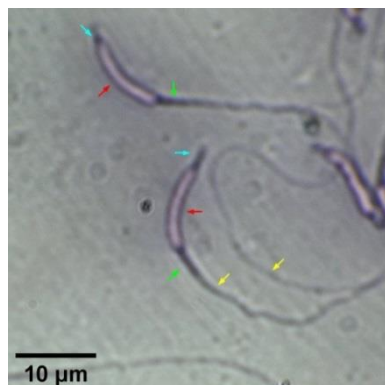
Abnormalitas sekunder terjadi di luar tubuli seminiferi, selama ejakulasi karena pemanasan atau pendinginan yang berlebih atau terkontaminasi air, urin dan antiseptik (Feradis, 2012).

Hal ini didukung oleh Feyisa *et*

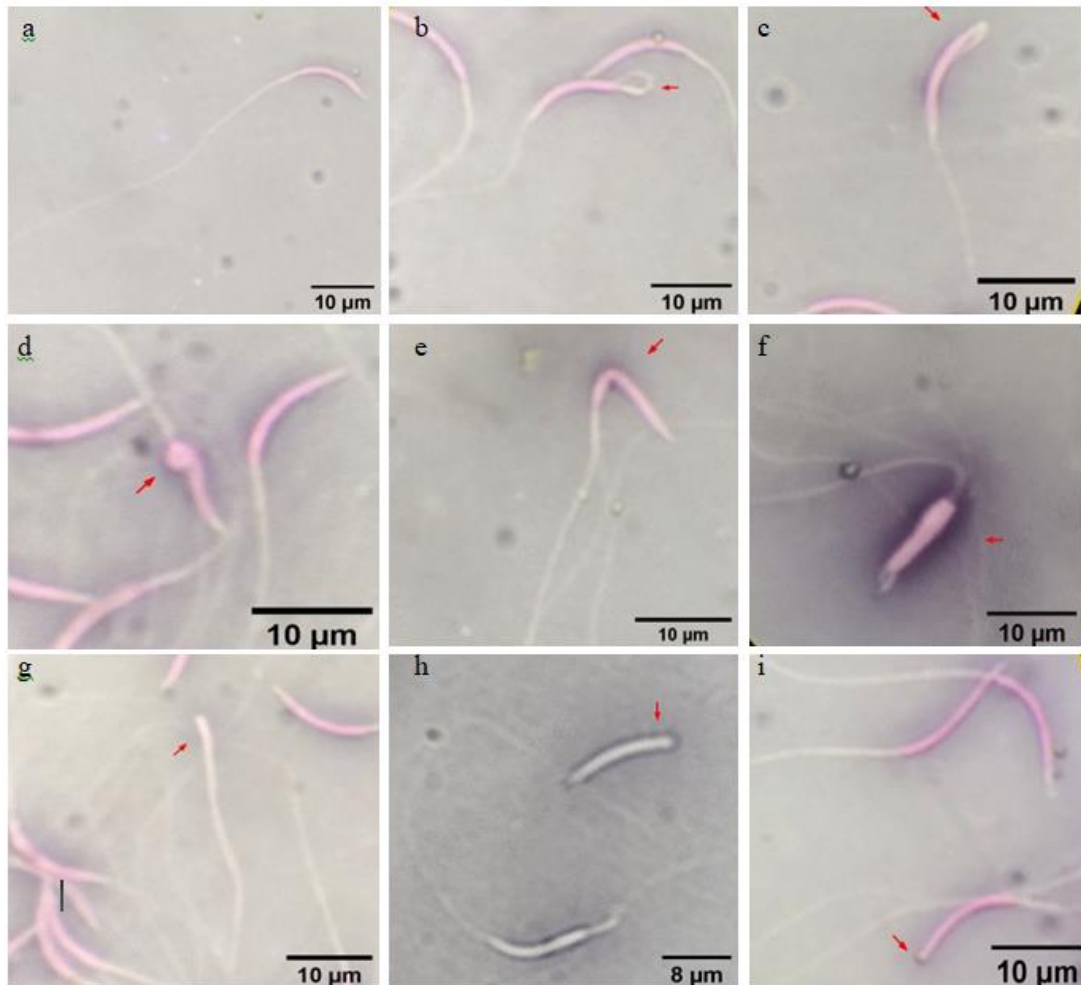
*al.*,(2018) bahwa abnormalitas sekunder dianggap muncul selama perjalanan melalui epididimis atau dengan penanganan yang salah setelah ejakulasi. Abnormalitas sekunder termasuk ekor yang putus, kepala tanpa ekor, bagian tengah yang melipat, adanya butiran protoplasma proksimal atau distal dan akrosom terlepas.

Tabel 2. Morfologi spermatozoa enam rumpun ayam lokal Indonesia

Morfologi spermatozoa	Hutan merah	Sentul	Gaga'	KUB	Arab	Bangkok
Normal (%)	71.0	95.0	71.5	90.5	95.0	94.5
Abnormal (%)	29.0	5.0	28.5	9.5	5.0	5.5
Ekor bengkok (%)	20.0	2.5	13.0	2.0	0.5	1.0
Ekor menyimpul (%)	1.5	1.5	-	1.0	-	-
Mid-piece bengkok (%)	4.5	-	11.0	2.0	1.0	2.0
Mid-piece terlepas (%)	-	-	0.5	-	-	-
Kepala bengkok (%)	0.5	-	1.5	-	-	-
Kepala bengkok (%)	-	-	-	-	0.5	0.5
Kepala menyimpul (%)	-	-	-	-	-	0.5
Kepala-mid-piece membengkok/menyimpul (%)	-	1	-	-	1.5	1.0
Tanpa kepala (%)	-	-	1.5	2.5	0.5	-
Tanpa ekor (%)	-	-	0.5	1.0	0.5	-
Tanpa akrosom (%)	2.5	-	0.5	1.0	0.5	0.5



Gambar 1. Struktur sel spermatozoa ayam yaitu akrosom (panah biru), kepala (panah merah), *mid-piece* (panah hijau), dan ekor (panah kuning).



Gambar 2. Morfologi spermatozoa. a. Normal, b. ekor membengkok  $180^{\circ}$ , c. *mid-piece* membengkok, d. antara kepala dan *mid-piece* menyimpul, e. kepala membengkok  $90^{\circ}$ , f. kepala membengkok, g. tanpa kepala, h. tanpa ekor, i. tanpa akrosom.

Identifikasi tersebut tidak mutlak dan tidak mempunyai batas yang jelas, karena *spermatozoa* tanpa ekor dapat pula disebabkan oleh gangguan patologik, aplikasi panas dan dingin pada testis atau defisiensi makanan dan beberapa abnormalitas *spermatozoa* yang bersifat genetic. Abnormalitas primer meliputi kepala terlampau besar (*macrocephalic*), kepala terlampau kecil (*microcephalic*), kepala pendek melebar, pipih memanjang, piriformis, kepala rangkap, ekor

berganda, bagian melipat, membengkok, membesar, bertaut abaxial pada pangkal kepala, ekor melingkar, putus, terbelah (Hardijanto *et al.* 2010).

Pada spesies unggas poligini, seperti mayoritas Galliformes, persaingan spermatozoa menentukan kualitas ejakulasi tinggi, yaitu tinggi motilitas dan dengan kelainan sperma rendah (Santiago-Moreno *et al.*, 2016). Abnormalitas spermatozoa ayam sentul, arab dan bangkok pada penelitian ini cukup rendah pada

kisaran 5% sedikit lebih tinggi dari laporan Ervandi (2017) yaitu 3% pada spermatozoa ayam arab 3% dan laporan Ervandi *et al.* (2020) yaitu 2.5% pada spermatozoa ayam Bangkok. (Ervandi, 2017). Namun hasil ini lebih rendah dari laporan Almahdi *et al.*, (2014) yaitu 9.07% pada spermatozoa ayam arab dan 13.78% pada spermatozoa ayam bangkok, demikian pula pada spermatozoa ayam Sentul yang dilaporkan oleh Mugiyono *et al.*, (2015) yaitu 6.51%. Abnormalitas spermatozoa ayam kampung unggul Balitnak (KUB) yang diperoleh pada penelitian ini 9.5% lebih tinggi dari laporan sebelumnya pada ayam kampung biasa yaitu 3.62 % (Hambu *et al.* 2016), namun mendekati laporan Khaeruddin *et al.* (2020) yaitu 9.81% pada ayam kampung biasa. Menurut Feyisa *et al.*, (2018) abnormalitas spermatozoa hidup di bawah 17% dalam semen segar terlalu rendah untuk menyebabkan masalah kesuburan dan daya tetas yang serius.

Abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini umumnya didominasi oleh pembengkokan ekor, di urutan kedua yaitu pembengkokan *mid-piece*. Spermatozoa tanpa akrosom juga ditemukan pada lima rumpun penelitian ini namun persentasenya sangat rendah. Akrosom penting artinya bagi spermatozoa karena membantu menembus sel telur pada proses fertilisasi. Menurut Alkan *et al.* (2002) akrosom dan *mid-piece* adalah organel ini adalah yang paling rentan faktor lingkungan. Persentase kepala bengkok pada spermatozoa ayam hutan 0.5% lebih rendah dari ayam hutan merah India yang dilaporkan sebelumnya yaitu 3% (Rakha *et al.*, 2015). Perbedaan hasil dengan penelitian sebelumnya mungkin dapat juga disebabkan karena umur ayam. Tingkat kecacatan morfologis spermatozoa berupa kepala bengkok 180°, ekor bengkok 180° dan ekor menyimpul meningkat seiring dengan peningkatan umur ayam broiler (Tabatabaei *et al.*, 2010).

## KESIMPULAN

Pengamatan karakteristik morfometrik spermatozoa menunjukkan bahwa ayam hutan merah memiliki panjang total dan panjang ekor yang lebih tinggi dibandingkan ayam sentul, gaga', KUB, arab dan Bangkok. Pengamatan karakteristik morfologi menunjukkan

bahwa spermatozoa dengan morfologi abnormal tertinggi pada ayam hutan merah dan ayam gaga'. Pembengkokan ekor, pembengkokan *mid-piece* adalah abnormalitas terbanyak yang ditemukan pada ayam lokal Indonesia.



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Balai Pembibitan Akusi, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Kabupaten Sinjai

dan Laboratorium Lapangan (Kandang Pemuliaan Ternak Unggas) Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alkan S, Baran A, Özdaş B, Evecen M. 2002. Morphological Defects in Turkey Semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 26: 1087-1092.
- Almahdi AB, Ondho YS, Sutopo. 2014. Comparative Studies of Semen Quality on Different Breed of Chicken in Poultry Breeding Center Temanggung-Central Java. *International Refereed Journal of Engineering and Science* 3(2): 94-103.
- Andraszek K, Banaszewska D, Biesiada-Drzazga B. 2018. The Use of Two Staining Methods for Identification of Spermatozoon Structure in Roosters. *Poultry Science* 97(7): 2575-2581.
- Ardhani F, Raharja IMU, Boangmanalu BM, Handoko J. 2018. Karakteristik Morfologik dan Morfometrik Spermatozoa Ayam Nunukan. *Jurnal Peternakan* 15 (2): 62-67.
- Birkhead T. 2000. *Promiscuity: An Evolutionary History of Sperm Competition*. London: Harvard University Press.
- Briskie JV, Montgomerie R, Birkhead TR. 1997. The Evolution of Sperm Size in Birds. *Evolution* 51: 937-45.
- Ervandi M. 2017. Motilitas dan Abnormalitas Bangsa Pejantan Setelah Penyimpanan. *Akademika* 6(2): 113-119.
- Ervandi M, Ardiansya W, Prahara S. 2020. Kualitas dan Fertilitas Spermatozoa sebagai Akibat Pejantan Berbeda. *Jambura Journal of Animal Science* 2(2): 29-37.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ. 2003. Head Dimensions of Cryopreserved Red Deer Spermatozoa are Affected by Thawing Procedure. *Cryo Letters* 24: 261-268.
- Esteso MC, Soler AJ, Fernandez-Santos MR, Quintero-Moreno AA, Garde JJ. 2006. Functional Significance of the Sperm Head Morphometric Size and Shape for Determining Freezability in Iberian red Deer (*Cervus elaphus*

- hispanicus) Epididymal Sperm Samples. *Journal of Andrology* 27: 662–670.
- Feradis. (2010). *Bioteknologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung: Alfabeta
- Feyisa SG, Park YH, Kim YM, Lee BR, Jung KM, Choi SB, Cho CY, Han JY. 2018. Morphological Defects of Sperm and Their Association with Motility, Fertility, and Hatchability in Four Korean Native Chicken Breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 31(8): 1160–1168.
- Garcia-Herreros M. 2016. Sperm Subpopulations in Avian Species: A Comparative Study Between the Rooster (*Gallus domesticus*) and Guinea fowl (*Numida meleagris*). *Asian Journal of Andrology* 18: 889-894.
- Haunshi S, Niranjana M, Shanmugam M, Padhi MK, Reddy MR, Sunitha R, Rajkumar U, Panda AK. 2011. Characterization of Two Indian Native Chicken Breeds for Production, Egg and Semen Quality, and Welfare Traits. *Poultry Science* 90: 314-320.
- Hambu EK, Arifiantini RI, Purwantara B, Darwati S. 2016. Raw Semen Characteristics of Three Different Indonesian Local Roosters. *Animal Production* 18(3): 165-172.
- Hardijanto, Sardjito T, Hernawati T, Susilowati S, Suprayogi TW. 2010. *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Immler S, Saint-Jalme M, Lesobre L, Sorci G, Roman Y, Birkhead TR. 2007. The evolution of sperm morphometry in pheasants. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1008–1014.
- Khaeruddin, Arismunandar, Nurda. 2020. Karakteristik Semen Ayam Kampung Yang Diberi Minyak Hati Ikan Kod Sebagai Feed Supplement. *Musamus Journal of Livestock Science* 3(1): 15-24.
- Kleven O, Fossoy F, Laskemoen T, Robertson RJ, Rudolfson G, Lifjedl JT. 2009. Comparative Evidence for the Evolution of Sperm Swimming Speed by Sperm Competition and Female Sperm Storage Duration in Passerine Birds. *Evolution* 63: 2466–2473.
- Łukaszewicz E, Jerysz A, Partyka A, Siudzinska A. 2008. Efficacy of Evaluation of Rooster Sperm Morphology Using Different Staining Methods. *Research in Veterinary Science* 85: 583-388.
- Maroto-Morales A, Ramon M, Garcia-Alvarez O, Soler AJ, Fernandez-Santos MR, Roldan ERS, Gomendio M, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ.

2012. Morphometrically-Distinct Sperm Subpopulations Defined by a Multistep Statistical Procedure in Ram Ejaculates: Intra- and Interindividual Variation. *Theriogenology* 77: 1529–1539.
- Mugiyono S, Saleh DM, Sukardi. 2015. Reproductive Performance of Various Breeds of Sentul Chicken. *Animal Production* 17 (3): 169-176.
- Peña FJ, Saravia F, García-Herreros M, Núñez-Martinez I, Tapia JA, Johannison A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2005. Identification of Sperm Morphometric Subpopulations in Two Different Portions of the Boar Ejaculate and Its Relation to Post-Thaw Quality. *Journal of Andrology* 26: 716–723.
- Rakha BA, Ansari MS, Hussain I, Malik MF, Akhter S, Blesbois E. 2015. Semen Characteristics of the Indian Red Jungle Fowl (*Gallus gallus murghi*). *European Journal of Wildlife Research*. 61, 3, 379-386.
- Rosita G, Prawesti LN, Fadlilah U, Nugrahini YLRE. 2020. Pengembangan Potensi Ayam Lokal untuk Menunjang Ketahanan Pangan di Era New Normal Covid-19. *Seminar Nasional Fakultas Pertanian UNS*. 4, 1, 352-460.
- Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Gañán N, Hierro MJ, Marchal F, Campo JL, Blesbois E. 2015. Characterization of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) sperm: seasonal changes and influence of genetic purity. *Poultry Science* 94: 80–87.
- Santiago-Moreno J, Estes MC, Villaverde-Morcillo S, Toledano-Diaz A, Castaño C, Velázquez R, Lopez-Sebastian A, Goya AL, Martínez JG. 2016. Recent Advances in Bird Sperm Morphometric Analysis and Its Role in Male Gamete Characterization and Reproduction Technologies. *Asian Journal of Andrology* 18: 1-7.
- Shanmugam M, Rajkumar U, Reddy M, Rao SR. 2012. Effect of Age on Semen Quality in Naked Neck and Dwarf Chicken Under Tropical Climatic Conditions. *Animal Production Science* 52: 964-568.
- Tabatabaei S, Chaji M, Mohammadabadi T. 2010. Correlation Between Age of Rooster and Semen Quality in Iranian Indigenous Broiler Breeder Chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9(1): 195-198.

- Vidal AF, Colominas JA. 2007. Genetic Quality of Red Legged Partridge in Spain and Proposals for Its Conservation and Improvement. *Selecciones Avícolas* 10: 667–672.
- Villaverde-Morcillo S, Estes MC, Castano C, Toledano Diaz A, Lopez-Sebastian A, Campo JL, Santiago-Moreno J. 2015. Influence of Staining Method on the Values of Avian Sperm Head Morphometric Variables. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 750–755.
- Wysokińska A, Kondracki S. 2019. Heterosis for Morphometric Characteristics of Sperm Cells From Duroc x Pietrain Crossbred Boars. *Animal Reproduction Science* 211: 106217.