

**PENILAIAN TERHADAP KESAN SEJUK BEKU SEMEN AYAM KAMPUNG
(*Gallus gallus*) MENGGUNAKAN ETILENA GLIKOL DAN GLISEROL
SEBAGAI PENGAWETAN-KRIO**

NURUL NASUHA BINTI MD FAUZAN

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN SEBAGAI MEMENUHI SEBAHAGIAN
SYARAT PENGANUGERAHAN IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
PERTANIAN DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM PENGELUARAN TERNAKAN
FAKULTI PERTANIAN LESTARI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2018**



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN TESIS

JUDUL: PENILAIAN TERHADAP KESAN SEJUK BEKU SEMEN AYAM KAMPUNG
(Gaius gaius) MENGGUNAKAN ETILENA GLIKOL DAN GLISEROL SEBAGAI
PENGAWETAN-KRIO

UJAZAH: SARJANA MUDA (DENGAN KEPWIJIAN) SAINS PERTANIAH - PENGELUARAN
TERNAKAN (HG36)

SAYA: MURUL MASUHA BINI MD FAUZAN SESI PENGAJIAN: 2014-2018
 (HURUF BESAR)

Mengaku membenarkan tesis *(LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. Sila tandakan (/)

SULIT (Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD (Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

[Signature]

(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: POS 63, KG
SARANG BUAYA, 83600
SEMERAH, BATU PAHAT
Johor

TARIKH: 18.1.2018

Disahkan oleh

[Signature]
 NURULAIN BINTI ISMAIL
 PUSTAKAWAN KANAN

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
 (TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

[Signature]
 SITI AISYAH SIDIK
 PENYARAH

FAKULTI PERTANIAH LESTARI
 UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

TARIKH: 18/1/18

Catatan:

*Potong yang tidak berkenaan.

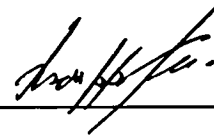
*Jika tesis ini SULIT dan TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

*Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana Secara Penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya. Saya juga mengakui bahawa disertasi ini tidak pernah atau sedang dihantar untuk perolehi ijazah dari universiti ini atau mana universiti yang lain.



NURUL NASUHA BINTI MD FAUZAN

BR14110066

29 NOVEMBER 2017



DIPERAKUKAN OLEH

1. Cik Siti Aisyah binti Sidik
PENYELIA
2. Prof. Dr. Abdul Rashid bin Baba
PENYELIA BERSAMA

S. Aisyah

SITI AISYAH SIDIK
PENSYARAH
~~FAKULTI PERTANIAN LESTARI~~
~~UNIVERSITI MALAYSIA SABAH~~



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Setinggi puji dan syukur saya hamparkan ke hadrat ilahi kerana limpah kurnia dan keizinanNya, maka dapatlah saya menyiapkan tugas projek akhir tahun ini mengikut tempoh yang ditetapkan. Dalam usaha ini saya banyak berhutang budi kepada pelbagai pihak.

Pertama sekali, setinggi-tinggi ucapan terima kasih yang tidak terhingga saya tujukan kepada penyelia saya, Cik Siti Aisyah binti Sidik dan penolong penyelia saya iaitu Prof. Dr. Abdul Rashid bin Baba yang memberi peluang kepada saya untuk pengalaman berharga dan pengetahuan dalam menjalankan projek tahun akhir saya. Saya amat berterima kasih kepada penyelia dan penyelia bersama saya kerana kesabaran mereka memberi bimbingan, pengetahuan yang meluas, pengawasan dan galakan di keseluruhan menyiapkan projek tahun akhir.

Selain itu saya ingin ingin berterima kasih kepada kedua ibu bapa saya Md Fauzan bin Mohd Yusof dan Aminah binti Kassim yang banyak memberi dorongan dan nasihat kepada saya untuk menyiapkan pojek ini. Saya juga ingin mengambil peluang ini mengucapkan terima kasih kepada staf-staf Fakulti Pertanian Lestari kerana menyediakan peralatan di makmal, menyediakan bahan-bahan kimia yang diperlukan dalam kajian ini.

Seterusnya, saya ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan terima kasih kepada rakan-rakan seperjuangan saya iaitu Sebastian abin, Mohd Faiz bin Abdul Rauf, Evelyn Koay Shin Rou, Norhaseena binti Mohd Salleh, Nursyafikah binti Othman dan juga rakan-rakan yang lain kerana turut membantu saya dalam kajian ini.

Akhir sekali, saya berterima kasih kepada semua pihak yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam penyediaan projek ini yang telah memberi kerjasama yang amat. Semoga Allah membalas segala jasa yang telah diberikan.

ABSTRAK

Objektif kajian ini adalah untuk menilai kesan sejuk beku terhadap semen ayam Kampung (*Gallus gallus*) dengan menggunakan kepekatan berlainan bagi Etilena glikol dan Gliserol sebagai Pengawetan-krio. Kajian ini telah dijalankan di rumah ayam separuh intensif, Fakulti Pertanian Lestari (FPL, Universiti Malaysia Sabah untuk pengumpulan semen dan makmal Anatomi Fakulti Pertanian Lestari (FPL) untuk penilaian semen. Tempoh kajian ini adalah dari Oktober sehingga November 2017. Dalam kajian ini empat ekor ayam kampung telah dipilih, secara rawak di mana air mani segar tersebut telah dikumpulkan dalam tiub appendorf. Kajian ini telah diulang sebanyak empat kali replikasi dengan menggunakan reka bentuk rawak lengkap. Air mani segar telah dikumpulkan dan dinilai berdasarkan beberapa ciri-ciri iaitu isipadu semen, kepekatan, warna dan konsistensi, motility (MMOT) dan molititi individu. Dalam kajian ini purata jumlah air mani yang dikumpulkan ialah 0.22 ± 0.02 ml dengan warna konsistensi yang dicatatkan ialah 2.25 ± 0.50 dan purata kepekatan ialah $1.08 \pm 0.02 \times 10^9$ sperma/ml, bagi purata MMOT pula ialah 4.75 ± 0.50 , pergerakan individu ialah 94.75 ± 3.40 . Setelah penilaian semen segar dilakukan, 350 μ l semen dilarutkan ke dalam 5 ml campuran Ringers dan rawatan yang berlainan kepekatan iaitu 5%, 8% dan 10% bagi Etilena glikol (ETG) dan Gliserol (G). Kemudian 300 μ l campuran tersebut (semen+rawatan) diletakkan kedalam 1.5ml tiub micro. Seterusnya tiub mirco diletakkan kedalam bekas yang direka khas yang berisi alkohol methanol 95%. Setelah itu penilaian semen untuk hari 0 dilakukan, suhu dicatatkan kemudian bekas diletakkan kedalam peti sejuk beku pada suhu 2°C dan suhu dicatatkan setiap setengah jam daripada 23°C hingga 5°C. Penilaian sperma seterusnya dilakukan pada hari ketiga dan keenam penyimpanan sejuk beku. Keputusan daripada hasil kajian mendapati terdapat perbezaan signifikan bagi daya maju sperma pada hari ke 3 (10% G) dan ke 6 (5% ETG, 8% ETG dan 10% ETG) bagi hari 0, pada hari ke 3 dan ke 6 terdapat penurunan tren. Seterusnya untuk kadar hidup sperma terdapat perbezaan signifikan bagi kesemua rawatan ($p < 0.05$). Pada hari ke enam rawatan 5% G adalah rawatan yang mempunyai purata yang tinggi (29.69 ± 2.33). dan 10% G menunjukkan purata terendah (19.81 ± 1.11). Terdapat penurunan tren bagi kadar hidup sperma merentasi hari ke-6. Kemudian kadar mati Sperma yang tertinggi bagi hari ke-6 ialah 10%G (80.19 ± 1.11) dan purata min terendah ialah 5% G (70.31 ± 2.33). terdapat perbezaan ketara bagi kesemua rawatan ($p < 0.05$) dan tren purata min adalah meningkat. Akhir sekali ialah abnormaliti sperma, trem bagi purata abnormality ialah meningkat merentasi hari ke-6. Terdapat pebezaan ketara bagi rawatan ETG dan G. Purata min tertinggi ialah 10%G (97.15 ± 6.40) dan yang terendah ialah 8% ETG (32.89 ± 5.23^b). Kesimpulannya rawatan 5% dan 8% ETG adalah rawatan yang sesuai untuk kaedah sejuk beku. pengawetan-krio.

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF FREEZING FOR KAMPUNG CHICKEN SEMEN USING ETHYLENE GLYCOL AND GLYCEROL AS CRYOPRESERVATION

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of freezing on Kampung chicken (*Gallus gallus*) semen by using different concentration of Ethylene glycol and Glycerol as cryopreservation. The study was conducted in semi-intensive chicken house, Faculty of Sustainable Agriculture (FPL), Universiti Malaysia Sabah for semen collection and laboratory of Anatomy of the Faculty of Sustainable Agriculture (FPL) for semen assessment. The study was conducted from October until November 2017. In this study, semen was collected from four kampung chicken in the microcentrifuge tube. There were four replicates using a Complete Randomized Design (CRD). In this study, the average amount of semen collected was 0.22 ± 0.02 ml with the colour of the consistency recorded at 2.25 ± 0.50 and the mean concentration was $1.08 \pm 0.02 \times 10^9$ sperm / ml, for MMOT average is 4.75 ± 0.50 , individual movement is 94.75 ± 3.40 after evaluation. Fresh semen is made, 350 μ l of semen is dissolved into 5 ml of Ringers mixture and different treatments of 5%, 8% and 10% of Ethylene glycol (ETG) and Glycerol (G). Then 300 μ l of the mixture (semen + treatment) was placed into 1.5ml of micro tube. Next the micro tube is placed into a specially designed container containing 95% methanol alcohol. The sperm test results were recorded on the third and sixth days of frozen storage. Results showed that there was a significant difference in the viability of sperm on day 3 (10% G) and to 6 (5% ETG, 8% ETG and 10% ETG) for day 0, on day 3 and 6. The survivor for sperm survival rate was significantly different for all treatments ($p < 0.05$). On the sixth day of treatment 5% G was the treatment with a high average (29.69 ± 2.33). and 10% G showed the lowest average (19.81 ± 1.11). There was a decrease in trend for sperm survival rate across day 6. The highest sperm-dead rate for the 6th day was 10% G (80.19 ± 1.11) and the lowest average mean was 5% G (70.31 ± 2.33). there was a significant difference in all treatments ($p < 0.05$) and mean average trends were increased. Finally, sperm abnormality, the trend for average abnormality is increase across day 6. There was a significant difference in the treatment of ETG and G. The highest average mean was 10% G (97.15 ± 6.40) and the lowest was 8% ETG (32.89 ± 5.23). In conclusion, 5% and 8% ETG treatments suggested as the best treatments for frozen methods.

ISI KANDUNGAN

Kandungan	Muka surat
Pengakuan	ii
Perakuan	iii
Penghargaan	iv
Abstrak	v
<i>Abstract</i>	vi
Isi Kandungan	vii
Senarai Jadual	ix
Senarai Rajah	x
Senarai Simbol, Unit dan Singkatan	xi
Senarai Formula	xii
BAB1 PENGENALAN	1
1.1 Bab Pengenalan	1
1.2 Justifikasi	2
1.3 Objektif	3
1.4 Hipotesis	3
BAB 2 ULASAN KEPUSTAKAAN	4
2.1 Pengawetan-krio	4
2.2 Kepentingan Pengawetan-krio	6
2.3 Teknik-teknik Pengawetan-krio	6
2.4 Jenis-jenis Perlindungan-krio	7
2.4.1 Gliserol	8
2.4.1.1 Kesan Sel dan Molekul bagi Gliserol	8
2.4.2 Etilena Glikol	9
2.5 Aplikasi Pengawetan-krio	9
2.5.1 Ocosit dan Embrio	9
2.5.2 Semen, Sperma dan Tisu Testikular	9
2.5.3 Sel Stem	10
2.6 Pengenalan Induk Ayam Tempatan	10
2.7 Anatomi dan Fisiologi bagi Pembiakan bagi Ayam Kampung	12
BAB 3 KAEDAH KAJIAN	13
3.1 Lokasi Kajian	13
3.2 Ayam Kampung Jantan dan Pengurusan Ayam	13
3.3 Pengumpulan Semen Ayam Kampung Jantan	14
3.4 Penyediaan Larutan	14
3.4.1 Penyediaan Larutan Ringers	14
3.4.2 Larutan Etilena glikol dan juga Gliserol	15
3.4.3 Penyediaan larutan Eosin-Nigrosin	15
3.5 Penyediaan Sampel	16
3.6 Penilaian Semen Ayam	17
3.6.1 Warna Sperma dan Konsistensi	17
3.6.2 Kadar Isipadu Sperma	18
3.6.3 Kadar Pergerakan Jisim Motilili Semen Segar (MMOT)	18



3.6.4 Kadar Kepekatan Sperma	19
3.6.5 Kadar Hidup dan Mati Sperma	19
3.6.5.1 Morfologi Sperma	20
3.7 Rekabentuk Eksperimen	21
3.8 Analisis Statistik	21
BAB 4 KEPUTUSAN	22
4.1 Kualiti Semen Segar dan Ciri-cirinya	22
4.2 Kualiti Semen bagi Rawatan Kawalan pada Suhu Bilik	23
4.3 Daya Maju Sperma	23
4.4 Kadar Hidup Sperma	24
4.5 Kadar Mati Sperma	25
4.6 Kadar Abnormaliti Sperma	26
BAB 5 PERBINCANGAN	28
5.1 Kualiti Semen Segar	28
5.2 Daya Maju Sperma	29
5.3 Sperma Hidup dan Mati	32
5.4 Kadar Abnormaliti Sperma	33
BAB 6 KESIMPULAN	35
RUJUKAN	36
LAMPIRAN	40



SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
3.1	Formula ringers	14
3.2	Campuran larutan etilena glikol dan gliserol bersama ringers	15
3.3	Persediaan Eosin-Nigrosin berdasarkan formula	15
3.4	Julat warna sperma dan kosistensi	17
3.5	Indeks motiliti bagi semen ayam (MMOT)	18
3.6	Rekabentuk eksperimen rawatan dan kawalan	21
4.1	Min isipadu (ml), jisim motility (MMOT), kepekatan sperma (ml), dan warna semen segar ayam kampung	24
4.2	Peratusan purata daya maju, hidup, mati dan abnormaliti sperma (%) bagi rawatan kawalan pada suhu bilik	23
4.3	Peratusan purata bagi pergerakan daya maju semen untuk kepekatan yang berbeza bagi Etilena glikol dan Gliserol pada hari 0, 3 dan 6 pada suhu -14.5°C	24
4.4	Peratusan purata bagi kadar hidup sperma untuk kepekatan yang berbeza bagi Etilena glikol (ETG) dan Gliserol (G) pada hari 0, 3 dan 6 pada suhu -14.5°C	25
4.5	Peratusan purata bagi kadar mati sperma untuk kepekatan yang berbeza bagi Etilena glikol (ETG) dan Gliserol (G) untuk hari 0, 3 dan 6 pada suhu -14.5°C	26
4.6	Peratusan perata bagi kadar abnormaliti sperma untuk kepekatan yang berbeza bagi Ethylene Glycol (ETG) dan Glycerol (G) untuk hari 0, 3 dan 6 pada suhu -14.5°C	27

SENARAI RAJAH

Rajah		Muka surat
2.1	Pembiakaan bagi Ayam jantan. Sumber daripada Jacob et al., 2011	12
3.1	Tempat penyimpanan yang direka untuk pemuliharaan	17
3.2	Contoh Hemasitometer yang digunakan untuk kepekatan sperma	19
3.3	Perbezaan antara sperma (a) mati dan (b) hidup	20
3.4	Ciri-ciri abnormaliti sperma pada $\times 400$ magnifikasi merentasi hari ke 6 (a) ekor bergulung, (b) kepala bengkok, (c) kepala bergulung, (d) leher bengkok	20

SENARAI SIMBOL, UNIT DAN SINGKATAN

%	Peratusan
°C	Darjah Selsius
=	Jumlah
ANOVA	Analisis varians
CRD	Reka bentuk Rawak Lengkap
FPL	Fakulti Pertanian Lestari
g	Gram
mL	Mikroliter
ETG	Etilena glikol
G	Gliserol
ml	Milliter
SE	Ralat piawai
MMOT	Kadar Pergerakan Jisim Motilili Semen Segar
DMSO	Dimetil sukfosida
NaCl	Sodium Klorida
pH	<i>Potential of hydrogen</i>
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Kalsium klorida dehydrate
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glukosa
NaHCO ₃	Natrium bikarbonat

SENARAI FORMULA

Formula

Muka surat

- 3.1 Kepekatan sperma per isipadu (mi)
= purata nilai sel \times faktor larutan $\times 10^4$

19



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Bab Pengenalan

Malaysia merupakan salah satu negara yang mempunyai baka ayam kampung (*Red Jungle Fowl*). Ayam kampung kebiasaannya ditemui di negara Selatan Asia seperti Thailand, Malaysia, Myanmar, Singapura, India Utara, Pakistan dan lain-lain. Ayam kampung ini selalunya dipelihara di kampung-kampung dan dibiarkan lepas di kawasan kebun dan sebagainya. Populasi ayam kampung telah mendapat perhatian oleh IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) di mana populasi ayam kampung ini semakin menurun di dalam habitat asli mereka (Birdlife International, 2012). Penurunan populasi ayam kampung ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti kawasan habitat yang terancam, pengumpulan ataupun pengutipan telur ayam yang tidak terkawal, pemangsaan dan penghibridan genetik dengan ayam tempatan (Subhani *et al.*, 2010).

Pengawetan-krio sperma dalam bidang ternakan terutamanya dalam burung tempatan seperti ayam, puyuh dan banyak lagi telah lama diperkenalkan sejak awal 50 tahun yang lalu (Blesbios *et al.*, 2007). Penggunaan kaedah pengawetan-krio sperma adalah salah satu kaedah yang digunakan untuk memanjangkan hayat sperma. Kaedah ini juga dapat memperkembangkan lagi teknik pembiakan, seperti pernian beradas (AI) dan juga pensenyawaan secara in-vitro (Medeiros *et al.*, 2002) dengan semen sejuk beku adalah penting dalam pembiakan dan pilihan baka bertujuan untuk meningkatkan lagi pengeluaran spesis baka yang bermutu secara domestik. Proses penyejuk bekuan semen ini beselarasan dengan teknologi pembiakbakaan yang dapat memelihara spesis yang terancam ataupun untuk menyelesaikan masalah kesuburan bagi lelaki (Andrabi dan Maxwell, 2007).

Sel sperma merupakan sperma yang sensitif terhadap perubahan sekeliling, dan mempunyai jangka hayat yang singkat. Sel sperma berbentuk haploid dan hampir tidak mempunyai sitoplasma, ianya dibentuk oleh nukleus besar dan padat dengan kromosom, nukleus ini membolehkan ianya berhubung dengan oosit semasa pensenyawaan berlaku. Sel sperma mempunyai aktiviti biosintetik yang sedikit dan ia sangat bergantung pada fungsi katabolik untuk mengekalkan kehidupannya (Barbas dan Mascarenhas, 2009).

Kaedah penggunaan perlindungan-krio seperti gliserol, dimetil acemide, etilena glikol dikenali sebagai bahan perlindungan-krio bagi spermatozoa, namun ia mempunyai had yang tersendiri (Hammerstedt dan Grahman, 1992). Kajian mendapati penurunan dalam daya maju spermatozoa unggas hutan India menggunakan prosedur rutin berdasarkan gliserol sebagai perlindungan-krio (Rakha *et al.*, 2016). Etilena glikol juga digunakan sebagai perlindungan-krio bagi sperma (Gilmore *et al.*, 2000). Oleh itu kajian ini adalah bertujuan untuk melihat keberkesanan ataupun perbezaan pengawetan-krio bagi gliserol dan juga etilena glikol dengan kepekatan yang berbeza apabila menggunakan alcohol methanol 95% sebagai simpanan sejuk beku secara perlahan selama 6 hari.

1.2 Justifikasi

Melalui kajian ini dapat di justifikasikan bahawa penggunaan perbezaan kepekatan bagi perlindungan-krio (*cryoprotectant*) dapat dilihat sebagai salah satu cara untuk memelihara sperma untuk kegunaan dan penyimpanan dalam jangka masa yang panjang dan dapat memelihara fizikal sperma, hal ini kerana sperma merupakan sel yang sensitif terhadap perubahan persekitaran. Ia juga boleh digunakan untuk melindungi baka-baka tertentu yang kian pupus terutama sekali hidupan liar. Selain itu pengawetan-krio ini dapat meningkatkan tahap pengeluaran baka domestik seperti bidang ruminan dan bukan ruminan, bidang ternakan tenusu, dan juga bidang ternakan ayam kampung dan sebagainya. Hal ini kerana pengawetan-krio merupakan salah satu kaedah untuk meneruskan aktiviti pernian berradas yang kian membangun dalam sektor penternakan.

Tambahan pula, kajian ini dapat dijustifikasikan bahawa penggunaan alkohol sebagai gantian untuk penggunaan cecair nitrogen. Penggunaan alkohol adalah lebih mudah dan dapat menjimatkan kos perbelanjaan di mana, kos bagi cecair nitrogen adalah mahal dan memerlukan penelitian apabila mengendalikannya. Hal ini kerana cecair nitrogen mudah tersejat kepada persekitaran sekiranya tidak dikendalikan dengan baik. Selain itu penggunaan alkohol dapat memudahkan penyimpanan bagi ahli-ahli saintis apabila melakukan aktiviti diluar makmal.

1.3 Objektif

Untuk menilai kesan sejuk beku terhadap semen ayam kampung (*Gallus gallus*) dengan menggunakan kepekatan berlainan bagi Etilena glikol dan Gliserol sebagai pengawetan-krio.

1.4 Hipotesis

H_0 : Tiada perbezaan signifikan bagi bahan kimia perlindungan-krio Etilena glikol dan Gliserol terhadap daya maju sperma berbanding dengan tiada perlindungan-krio.

H_A : Terdapat perbezaan signifikan bagi bahan kimia perlindungan-krio Etilena glikol dan Gliserol terhadap daya maju sperma berbanding dengan tiada perlindungan-krio.

BAB 2

ULASAN KEPUSTAKAAN

2.1 Pengawetan-krio

Pada awal 1600an kaedah pengawetan-krio masih lagi ketinggalan sehinggalah terdapatnya perkembangan pernian beradas (*Artificial Insemination*) pada awal 1960an, apabila Industri lembu tenusu memerlukan kaedah penyimpanan untuk sperma pejantan, dan setelah itu pengawetan-krio sperma menjadi popular di dalam kajian saintis. Polge *et al.* (1949) menemukan kegunaan gliserol sebagai perlindungan-krio (*cryoprotectant*) yang boleh melindungi sel terutama sekali sel sperma pada suhu yang rendah.

Perkembangan protokol pengawetan-krio untuk lembu pejantan adalah untuk tujuan pernian berhad, bagi memperkenalkan percubaan untuk pembekuan sperma jantan sehingga suhu -79°C dan di simpan di dalam ais kering. Kajian mendapati percubaan itu masih lagi dapat mengekalkan tahap kesuburan sperma (Bratton *et al.*, 1955).

Dalam pembangunan teknologi yang semakin pesat kini, bidang pembiakan haiwan ternakan juga tidak ketinggalan. Ia bertujuan untuk meningkatkan pengeluaran hasil ternakan di negara Malaysia. Penggunaan teknologi seperti pemuliharaan semen ini telah lama dipraktikkan dan pelbagai cara telah dijalankan untuk meningkatkan keberkesanannya.



Namun begitu kajian sebelum ini menyatakan terdapat ketidakseragaman yang signifikan dalam hasil penyelidikan sebelumnya mengenai protokol perlindungan-krio (*cryoprotectant*) yang optimum dan protokol pengawetan-krio itu sendiri, di sini ia menjelaskan terdapat beberapa faktor yang membawa kepada ketidaksuaian ini, seperti baka ternakan yang digunakan, komposisi yang berbeza dari pencair semen (*diluents*), kepekatan agen perlindungan-krio, kaedah penyejukan ataupun penyahbeku dan kadar penyejukan (Abouelezz *et al.*, 2015). Kaedah pembungkusan sperma di dalam *straw*, dan bilangan sel sperma yang digunakan untuk pembiakan (Blesbois *et al.*, 2006).

Pengawetan-krio ini telah digunakan didalam pelbagai spesis haiwan termasuklah kambing (Sanchez-Partida *et al.*, 1992), lembu (Goffaux, 1991), unggas (Rakha *et al.*, 2016), dan banyak lagi. Pengawetan-krio sperma digabungkan dengan pernian beradas yang telah diktiraf kerana mempunyai nilai yang tinggi dalam pemuliharaan ex-situ bagi spesis terancam (Blanco *et al.*, 2000). Keberkesanan teknik ini adalah berdasarkan kualiti proses sejukbeku dan juga proses penyahbeku yang betul. Teknik pengawetan-krio dan juga protokol pensenyawaan in-vitro adalah penting di dalam kajian genetik dan juga penghasilan haiwan transgenik.

Keberhasilan pengawetan-krio bagi sperma spesies unggas ini tidak begitu berjaya seperti mamalia yang lain, hal ini disebabkan beberapa faktor khususnya bentuk fizikal pembiakan, kepelbagaian spesis dan baka yang membawa kepada tidak balas sperma yang berbeza apabila dibekukan (Blesbois *et al.*, 2006). Terdapat kajian yang menyatakan kebolehan sesuatu sperma dan juga tindak balasnya dalam pengekal semen terhadap suhu rendah, semasa nyah beku, sejuk beku, fasa ini adalah berbeza dengan antara spesis dengan spesis yang lain (Han *et al.*, 2005).

Kadar sejuk beku dan penyahbeku boleh mempengaruhi kemandirian-krio (*cryosurvival*) sperma, penggunaan kadar penyejukan yang optimum adalah untuk mengurangkan kecederaan-krio (*cryo-injuries*) sperma iaitu gangguan membran plasma sperma dan struktur DNA, yang disebabkan oleh pembentukan ais intrasel yang luas serta perubahan dalam pH intrasel dan komposisi ion (Mazur *et al.*, 1970). Kebiasaannya semen dicairkan di dalam pengekal yang mengandungi perlindungan-krio yang berfungsi untuk mengurangkan penghabluran intraselular.

2.2 Kepentingan Pengawetan-krio

Pengawetan-krio merupakan salah satu cara untuk memulihara germplasma yang digunakan di dalam pertanian, perikanan, bioteknologi, dan pemuliharaan bagi spesis terancam. Di dalam pertanian pengawetan germplasma ini adalah untuk meningkatkan genetik bagi spesis haiwan domestik, untuk memelihara baka yang jarang ditemui, meningkatkan ketahanan terhadap perubahan persekitaran dan pertukaran germplasma di peringkat antarabangsa bertujuan untuk memulihara baka.

Selain itu, pengawetan-krio ini juga penting bagi spesis yang terancam, program pengurusan genetik dan juga boleh dilakukan untuk sumber simpanan genetik untuk kegunaan masa akan datang. Ini telah dinyatakan apabila kajian mendapati bahawa semen kambing biri-biri jantan yang disejuk bekuan boleh bertahan selama 27 tahun tanpa memberi kesan kepada kesuburan sperma, sumber genetik dapat dipelihara (Salamon dan Maxwell, 2000).

Kaedah pengawetan-krio ini boleh dilakukan untuk memelihara haiwan terancam dan juga baka yang terancam. Untuk memaksimumkan kepelbagaian genetik dan juga untuk haiwan yang jarang ditemui daripada keluarga Bovidea di mana 1000 sperma dikumpulkan daripada 25 jantan yang berlainan (Camizzoli *et al.*, 2000)

2.3 Teknik-teknik Pengawetan-krio

Pengawetan-krio adalah teknik yang menggunakan suhu yang rendah untuk memelihara sel-sel dan tisu untuk jangka masa yang panjang. Ini berdasarkan kepada jenis sel ataupun sel bagi sesuatu spesis mamalia, di mana terdapatnya perbagai respon biologi-krio dan juga kemandirian-krio apabila disejuk bekuan dan kemudiannya di nyahbeku. Pengawetan-krio ini boleh dikelaskan mengikut jenis pengawetan-krio itu sendiri, ianya termasuklah penyejuk bekuan perlahan dan vitrifikasi yang melibatkan pemejalan daripada persekitaran air atau tisu kepada fasa non-kristal (*noncrystalline glassy phase*), proses penyimpanan tanpa had (*subzero non-freezing storage*) dan pemeliharaan dalam keadaan kering (*dry state*).

Kaedah pengawetan–krio boleh dilakukan dengan menggabungkan perlindungan-krio dengan sel ataupun tisu sebelum disejukkan, kemudian sel disejukkan pada suhu yang rendah dan ditetapkan, seterusnya ialah proses nyah bekuan tisu ataupun sel. Terakhir sekali penyingkiran perlindungan-krio setelah nyahbekuan dilakukan (Gao *et al.*, 2016).

Di dalam sejukbeku dan nyahbekuan selain pembekuan, fasa pemanasan juga penting untuk kemandirian sperma (Fisher *et al.*, 1987). Semasa penyahbekuan, semen beku akan melalui tahap suhu kritikal iaitu antara -15 dan -60°C. Kadar pancairan bergantung kepada kadar penyejukan sama ada tinggi yang mendorong kepada pembentukan intrasel ataupun rendah yang menghasilkan dihidrasi sel.

Sperma merupakan sel yang sensitif-krio pada suhu 37°C ke bawah yang boleh membawa kepada kecederaan-krio (kryoinjury). Kecederaan krio ini adalah disebabkan oleh kerosakan sel apabila melalui fasa perubahan air pada persekitaran ekstrasel dan intrasel pada suhu yang rendah. Penyejukan dan nyahbeku sperma boleh mempengaruhi fizikal kimia dan tindakbalas biofizikal sperma itu, yang boleh memberi kesan kepada kelangsungan hidup sperma (Gao *et al.*, 2016). Mekanisma kecederaan-krio melibatkan pecahan osmotik yang disebabkan oleh kepekatan larutan intrasel ataupun luar sel, dan pembentukan ais di dalam intersel (McGann *et al.*, 1988). Selain itu, had daya maju sperma juga ditentukan dari segi ketahanan membran plasma yang berfungsi sebagai sifat separa telap.

2.4 Jenis-jenis Perlindungan-krio

Kebiasaannya perlindungan-krio adalah berbentuk cecair yang berperanan untuk mengurangkan kerosakan sperma semasa proses penyejukbekuan yang merupakan salah satu proses di dalam kaedah pengawetan-krio. Perlindungan-krio haruslah mudah menembusi sel sperma dan kurang kepekatan toksik, bagi mengelakkan dari perubahan fizikal sperma. Kepekatan perlindungan-krio penting yang optimum penting bagi mendapatkan sperma yang tahan lasak dan ianya bergantung kepada jenis sel dan juga tisu. Perlindungan-krio boleh dibahagikan kepada dua ketogori iaitu perlindungan-krio sel telap membran (*cell membrane-permeating cryoprotectants*) seperti dimetil sukfosida (DMSO), gliserol, etilena glikol dan lain. Kedua ialah perlindungan-krio sel membran tidak

telap seperti 2-metil-2,4-pentenediol dan polimer seperti polivinil pinolidon, kanji hidroksietil, dan pelbagai gula.

2.4.1 Gliserol

Gliserol digunakan sebagai perlindungan-krio terhadap sperma unggas untuk kaedah pengawetan-krio. Penyingkiran gliserol secara perlahan penting untuk mengurangkan kesan kerosakan sperma yang mungkin berkaitan dengan ketidakseimbangan proses osmotik yang merentasi sel membran. Ketidakseimbangan proses osmosis disebabkan oleh penyahbeku gliserol dengan media yang tidak menggunakan gylsrol sebelum pemanian beradas dilakukan (Hammerstedt dan Graham 1992). Polge *et al.* (1949) menjumpai kesan perlindungan-krio bagi gliserol. Sebatian ini merupakan sebatian yang paling berkesan dari segi aditif sehingga kesan perlindungan DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) ditemukan oleh Lovelock dan Bishop (1959). Gliserol yang tidak mempunyai elektrolit, bertindak mengurangkan kepekatan eletrolit dalam larutan sisa yang tidak beku pada intersel dan disekitar luar sel pada sebahagian suhu tertentu. Gliserol ini digunakan secara meluas dalam proses penyimpanan bakteria dan juga sperma haiwan.

2.4.1.1 Kesan Sel dan Molekul bagi Gliserol

Kajian mendapati terdapat kerosakan pada sperma ayam jantan sebelum pemanian beradas dilakukan yang berpunca daripada ketidakseimbangan osmotik merentasi membran sperma setelah dilarutkan ke dalam gliserol bebas iaitu tanpa larutan pengekal semen. Sel menjadi kecut dan fizikal sperma berubah. Penggunaan gliserol selalunya digunakan pada kadar kepekatan 6 hingga 8%. Kepekatan yang berlebihan akan menyebabkan kerosakan sel sperma dan ini akan merendahkan tahap ketahanan hidup sewaktu proses nyahbekuan. Kajian mendapati 4-6% kepekatan gliserol adalah kepekatan yang sesuai dan sejuk beku pada 10-100°C/minit (Byrne *et al.*, 2000; Anel *et al.*, 2003).

2.4.2 Etilena Glikol

Etilena glikol merupakan sebatian organik dengan formula $(\text{CH}_2\text{OH})_2$. Kegunaan etilena glikol adalah bahan mentah untuk fiber poliester dan juga bahan utama untuk formula anti pembekuan. Ia bersifat tidak berbau, tidak berwarna, dan merupakan cecair likat. Apabila Etilena glikol dilarutkan di dalam air ia akan mengganggu ikatan hidrogen. Cecair ini akan beku pada suhu -12°C , tetapi apabila dicampurkan dengan air, campuran ini tidak mudah bertukar kepada kristal. Oleh itu pembekuan tidak mudah berlaku. Khususnya bagi campuran 60% etilena glikol dan juga 40% air membeku pada -45°C . Keupayaan antibekuan etilena glikol telah menjadikannya sebagai komponen campuran vitrifikasi untuk pemeliharaan biologi sesuatu tisu dan organ pada suhu yang rendah (Rebsdats dan Meyer, 1980).

2.5 Aplikasi Pengawetan-krio

2.5.1 Oosit dan Embrio

Teknik pengawetan-krio bagi oosit matang terbukti dapat mengekalkan kapasiti pembiakan. Hasil daripada kajian tentang retrospektif mengenai 11,768 embrio manusia yang dikekalkan untuk menjalani satu kitaran penyahbeku dari tahun 1986 hingga 2007 menunjukkan bahawa tiada kesan yang signifikan terhadap tempoh tersebut terhadap penyimpanan, kehamilan, keguguran, implantasi ataupun kadar kelahiran hidup sama ada menggunakan pensenyawaan in-vitro ataupun kitaran sumbangan oosit (Riggs *et al.*, 2010)

2.5.2 Semen, Sperma dan Tisu Testis

Pengawetan-krio dapat diaplikasikan di dalam pengawetan-krio sperma bagi pelbagai jenis spesis. Kajian terhadap pemuliharaan sperma ayam belanda untuk melihat kesan pembiakbakaan, sejuk beku dan penyahbeku terhadap kualiti semen, pensenyawaan dan juga penetasan telur. Kajian ini menggunakan gliserol dan DMA (*dimetilacetamide*) sebagai perlindungan-krio dan mendapati sperma ayam belanda yang dibekukan menggunakan gliserol mempamerkan integriti membran yang lebih tinggi berbanding kualiti membran apabila dicairkan daripada sperma ayam belanda yang dibekukan dengan DMA. Walaupun tiada perbezaan motiliti, dan hanya terdapat perbezaan minima dalam gerakan progresif, dikesan di dalam rawatan pemuliharaan ini.

2.5.3 Sel Stem

Sel stem dewasa dapat dibezakan dengan pelbagai jenis sel tertentu dan boleh di dapati daripada pelbagai jenis lokasi seperti tulang sumsum, tisu lemak, periosteum, cecair amnion dan darah daripada tali pusat (Miyagi-Shiohira *et al.*, 2015). Bidang tisu kejuruteraan, terapi gen, ubat regeneratif, dan transplantasi sel sebahagian besarnya bergantung kepada keupayaan untuk memelihara, menyimpan dan mengangkut sel stem ini tanpa pengubahsuaian kandungan genetik atau sel (Jang *et al.*, 2016)

2.6 Pengenalan Induk Ayam Tempatan

Baka ayam tempatan iaitu ayam kampung merah (*Gallus gallus*) adalah terdiri daripada keluarga Phasianidea. Ia dianggap sebagai baka terawal bagi ayam domestik (Gautier, 2002). Ayam kampung merah ini mempunyai beberapa jenis spesis iaitu *G. g. bankiva*, *G. g. jabouilli*, *G. g. spadiceus*, *G. g. gallus* and *Gallus gallus murghi* di mana ianya terbahagi mengikut asal usul yang tertumpu kepada negara barat daya seperti Myanmar, Thailand, Semenanjung Malaysia, Singapura, Sumatera Utara, Himalaya utara- barat, utara India dan juga Pakistan (Birdlife International, 2012)

Indian Red Jungle fowl (G. gallus) merupakan baka yang berasal daripada Asia Selatan tetapi populasi terhad di kawasan India Utara dan Azad Jammu dan Kashmir, Pakistan (Subhani *et al.*, 2010). Populasi burung unggas merah India di dapati tidak seragam dan berpecah dalam kawasan lingkungan peredarannya. Oleh itu menyebabkan

pengurangan genetik sentiasa menurun (Peterson dan Brisbin, 1998). Terdapat beberapa laporan menunjukkan penurunan populasi burung unggas merah India disebabkan oleh penghapusan tempat tinggal ataupun habitat oleh manusia untuk pembangunan seperti perumahan, kilang dan bnyak lagi, aktiviti pengumpulan telur yang tidak terkawal, percampuran genetik dengan ayam domestik yang lain turut menyumbang kepada penurunan populasi genetik ayam kampung merah (Subhani *et al.*, 2010). Ayam kampung merah sering dipelihara di kawasan perkampungan ataupun hutan. Pembiakaan untuk ayam kampung domestik kini merupakan mekanisma yang agak rumit dengan pelbagai persekitaran dan faktor fizikal untuk berinteraksi dan menyumbang kepada keberhasilan dalam pensenyawaan (Malik *et al.*, 2013).

Secara amnya ayam kampung ini mempunyai bentuk fizikal yang kecil, mempunyai bulu yang pelbagai warna. Saiz telur bagi ayam kampung tidak melebihi 42g dan selalunya ayam boleh mencapai berat 1.0 hingga 1.5 kg pada umur mencecah empat hingga 5 bulan (Aini, 1990). Bagi daging ayam kampung, ia mempunyai rasa yang enak berbanding dengan ayam komersial yang lain, dan ayam kampung ini terbukti mempunyai kadar lemak yang rendah berbanding dengan ayam komersial. Hal ini kerana ayam kampung lebih banyak bergerak berbanding dengan ayam komersial (Engku Azahan *et al.*, 1990).

Menurut Peterson dan Brisbin (1999) ayam kampung jantan mempunyai warna bulu yang menyerlah berbanding dengan betina. Pada bulan Jun hingga Oktober ayam kampung akan menggugurkan pada bulu eclipse. Bulu tersebut khusus untuk ayam jantan. Musim pembiakan bagi ayam kampung ialah pada musim bunga dan juga musim panas untuk negara yang bermusim. Anak ayam kampung akan menetas dan hidup pada musim panas. Telur akan dihasilkan dan akan dieram selama 21 hari, anak ayam akan berkembang di dalam telur. Pada hari pertama hati dan saluran darah anak ayam akan berfungsi, kepala mula membentuk. Pada hari keempat organ dalaman anak ayam terbentuk. Hari kelima stuktur jantina terbentuk. Pada hari ke-13 tulang terbentuk dengan menggunakan kalsium daripada kulit telur. Pada hari ke-21 anak ayam telah lengkap, dan kulit telur mula retak dan anak ayam menetas (North dan Bell, 1990).

RUJUKAN

- Abouelezz, F. M. K., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M. C., López-Sebastián, A., Campo, J. L. and Santiago-Moreno, J. 2015. Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals* **50(1)**:135-141
- Aini, I. 1990. Indigenous chicken production in South-east Asia. *World's Poultry Science Journal* **46(1)**: 51-57
- Aitken, R. J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development* **7(4)**: 659-668
- Andrabi S, Maxwell W. 2007. A review on reproductive biotechnology for conservation of endangered mammalian Species. *Animal Reproduction Science* **99**:233-243
- Anel, L., De Paz, P., Alvarez, M., Chamorro, C. A., Boixo, J. C., Manso, A. and Anel, E. 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* **60(7)**:1293-1308
- Barbas, J. P., and Mascarenhas, R. D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* **10(1)**: 49-62
- Birdlife International, 2012. Gallus Gallus. The IUCN Red List of Threatened Species. Cited: 27. November 2017
- Blanco, J. M., Gee, G., Wildt, D. E. and Donoghue, A. M. 2000. Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance in Poultry, Eagle, and Peregrine Falcon Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **63(4)**: 1164-1171
- Blash, S., Melican, D., Gavin, W., 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* **54**: 899-905
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal* **63(2)**: 213-222.
- Blesbois, E. 2007. Advances in avian semen cryopreservation. *INRA, France*, 1-7.
- Blesbois, E., Dubos, F., Grasseau, I., Richard, M. M., Roman, Y., Saint Jalme, M. and Seigneurin, F. 2006. Cryopreservation of Avian Spermatozoa and Predictors of Ability to Freezing. *Lesactes du BRG* **6**: 415-431
- Bratton, R. W., Foote, R. H. and Cruthers, J. C. 1955. Preliminary fertility results with frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science* **38(1)**: 40-46
- Burrows, W. H., & Quinn, J. P. 1935. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Science* **14(4)**: 251-253
- Campo, J. L. and Santiago-Moreno, J. 2015. Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals* **50(1)**: 135-141
- Clarke, R. N., Sexton, T. J., Ottinger, M. A. 1982. Effect of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility and fertility of chicken and turkey semen. *Poultry Science* **61**: 1912-1917
- Comizzoli, P., Mermillod, P. and Mauget, R. 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development* **40(5)**: 493-504
- Engku Azahan, E. A., Yeong, S. W. and Noraziah, M. 1990. Intensive rearing of kampung chickens for meat production. In *Proceedings, 2nd Congress Veterinarian Association, Malaysia* pp. 108-110
- Evans, G. and Maxwell, W. C. 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats (No. Ed. 2). *Butterworths*. pp. 194
- Fiser, P. S. and Fairfull, R. W. 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* **23(6)**: 518-524

- Freshney, R. I. 2000. Biology of cultured cells. *Culture of Animal Cells*.
- Gao, D., Mazur, P. and Critser, J. K. 1997. Fundamental Cryobiology of Mammalian Spermatozoa. In: Reproductive Tissue Banking pp: 263-328
- Gao, H. H., Li, Z. P., Wang, H. P., Zhang, L. F. and Zhang, J. M. 2016. Cryopreservation of whole bovine ovaries: comparisons of different thawing protocols. *Eur J Obstet Gynecol Reproduction Biology* **204**: 104–107
- Gautier, Z., 2002. Gallus gallus (On-line), Animal Diversity Web, accessed 31.05.16 at http://animaldiversity.org/accounts/Gallus_gallus
- Gilmore, J. A., Liu, J., Woods, E. J., Peter, A. T. and Critser, J. K. 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction* **15(2)**: 335-343
- Goffaux, M. (1991). Techniques de congélation de la semence de taureau. *Unceia El. and Ins* **241**: 3-18
- Helmenstine, A. M. 2014. Ringer's Solution Recipe. Retrieved July 1, 2015 from <http://chemistry.about.com/od/labrecipes/a/Ringer-S-Solution-Recipe.html>
- Hammerstedt, R. H. and Graham, J. K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* **29(1)**: 26-38
- Han, X.F., Niu, Z.Y., Liu, F.Z., Yang, C.S., 2005. Effects of Diluents, Cryoprotectants, Equilibration Time and Thawing Temperature on Cryopreservation of Duck Semen. *International Journal Poultry Science* **4**: 197–201
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R. and Han, J. 2017. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research* **6(1)**: 12-18
- Jacob, J., Pescatore, T. and Cantor, A. 2011. Avian digestive system. *University of Kentucky–College of Agriculture* cited: 28.11.2017.
- Long, J. A., Bongalhardo, D. C., Pelaez, J., Saxena, S., Settar, P., O'Sullivan, N. P., & Fulton, J. E. 2010. Rooster semen cryopreservation: effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science* **89(5)**: 966-973
- Lovelock JE, Bishop MW. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* **183**: 1394–1395
- Łukaszewicz, E., Jerysz, A., Partyka, A. and Siudzińska, A. 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Research in veterinary Science* **85(3)**: 583-588
- Malik, A., Haron, A. W., Yusoff, R., Nesa, M., Bukar, M., & KASIM, A. 2013. Evaluation of the ejaculate quality of the red jungle fowl, domestic chicken, and bantam chicken in Malaysia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **37(5)**: 564-568
- Massip, A. 2001. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reproduction in Domestic Animal* **36**: 49–55
- Mazur, P., Leibo, S. P., Farrant, J., Chu, E. H. Y., Hanna, M. G. and Smith, L. H. 1970. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In *Ciba Foundation Symposium-The Frozen Cell*. pp. 69-88.
- McGann, L. E., Yang, H. Y. and Walterson, M. 1988. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* **25**: 178–185
- McDaniel, G. R. and Craig, J. V. 1959. Behavior Traits, Semen Measurements and Fertility of White Leghorn Males. *Journal of Poultry Science* **38**: 1005–1014
- Medeiros, C. M., Forell, F., Oliveira, A. T. and Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't better. *Theriogenology* **57**: 327-344

- Memon, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y. M., Ebrahimi, M., Nadia, F. M. and Audrey, G. 2011. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk pengokal. *Animal Reproduction Science* **129(1)**: 44-49
- North, M. O. and Bell, D. D. 1990. Commercial chicken production manual. Van Nostrand Reinhold
- Omeje, S. S. I. and Marire, B. N. 1990. Evaluation of the semen characteristics of adult cocks of different genetic backgrounds. *Theriogenology* **34(6)**: 1111-1118
- Peña, A, Linder-Forseberg C.2000. Effects of equex, one- or twostep dilution, and two freezing and thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* **54**: 859-875
- Perry, E. J. 1955. Artificial insemination of farm animals. *Rutgers University Press*: New Brunswick.
- Peterson, A. T. and Brisbin, I. L. 1998. Genetic endangerment of wild Red Junglefowl *Gallus gallus*?. *Bird Conservation International* **8(4)**: 387-394
- Polge, C., Smith, A. U. and Parkes, A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **164(4172)**: 666
- Purdy, P. H. 2006. A Review on Goat Sperm Cryopreservation. *Small Ruminant Research* **63**: 215-225
- Rakha, B. A., Ansari, M. S., Akhter, S., Hussain, I. and Blesbois, E. 2016. Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Animal Reproduction Science*, **174**: 45-55
- Rebsdat, S. and Mayer, D. 2001. Ethylene oxide. Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry.
- Riggs, R., Mayer, J., Dowling-Lacey, D., Chi, T. F., Jones, E. and Oehninger, S. 2010. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertile Sterility* **93**: 109-115
- Roca, J., Gil, M. A., Hernandez, M., Parrilla, I., Vazquez, J. M., & Martinez, E. A. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in pengokal supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* **25(3)**:397-405.
- Romboli, D. K. Flock, A. Franchini (Eds.), 12th European Poultry Conference, 10-14 September 2006, Verona, Italy: Abstracts and Proceedings, Ithaca, NY (2006)
- Rebsdat, S., Mayer, S., Alfranseder, J. and Riedl, J. and Hoechst Aktiengesellschaft. 1980. Process for improving the activity of used supported silver catalysts. U.S. Patent 4, 186,106.
- Safalaoh, A. C. L. 1997. Characteristics of indigenous chickens of Malawi. *Animal Genetic Resources/Resources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales* **22**: 61-69.
- Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* **62(1)**: 77-111
- Sanchez-Partida, L. G., Maxwell, W. M., Paleg, L. G. and Setchell, B. P. 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* **4(1)**: 113-118
- Senger, P. L. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. *Washington State University*: Current Conceptions.
- Siegfried Rebsdat; Dieter Mayer 2005, "Etilena glikol", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim: Wiley-VCH, doi:10.1002/14356007.a10_101
- Siudzinska, A, Lukaszewick, E. 2008. The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. *Animal Science Papers and Reports* **4**: 331-340
- Shamsuddin, M., Amiri, Y. and Bhuiyan, M. M. U. 2000. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reproduction in Domestic Animals* **35(2)**: 53-57

- Solihati, N., Idi, R., Setiawan, R. and Asmara, I. Y. 2006. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen Cair Ayam Buras pada Suhu 5 0C terhadap Periode Fertil dan Fertilitas Sperma (The Storage Time Effect of The Local Chicken Chilled Semen at 5 0C on Fertility and Fertile Period of Sperm). *Jurnal ilmu ternak*, **6(1)**.
- Squires, E. L., Keith, S. L. and Graham, J. K. 2004. Evaluation of Alternative Cryoprotectants for Preserving Stallion Spermatozoa. *Theriogenology* **62**: 1056-1065
- Subhani, A., Awan, M. S., Anwar, M., Ali, U. and Dar, N. I. 2010. Population status and distribution pattern of red jungle fowl (*Gallus gallusmurghi*) in Deva Vatala National park, Azad Jammu and Kashmir. Pakistan: *A Pioneer Study. Pakistan Journal of Zoology* **42**: 701–706
- Tarekegn, G. 2016. A Review Article of Artificial Insemination in Poultry. *Journal of World's Veterinary* **6(1)**: 26-35
- Tarvis, K. M. 2013. New Methods for Cryopreserving Rooster Spermatozoa. Degree of Master of Science. *Colorado State University Veterinary Science* **85**: 583-588
- Yang, C. H., Wu, T. W., Cheng, F. P., Wang, J. H. and Wu, J. T. 2016. Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reproductive Biology* **16(1)**: 41-46