

**KRIOPRESERVASI SEMEN IKAN BARONANG *Siganus guttatus*  
MENGUNAKAN BEBERAPA JENIS LARUTAN EXTENDER**

**OLEH :**

**LARAYANTI**

**H411 12 901**



**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2017**

**KRIOPRESERVASI SEMEN IKAN BARONANG *Siganus guttatus*  
MENGUNAKAN BEBERAPA JENIS LARUTAN EXTENDER**

*Skripsi ini disusun untuk melengkapi tugas dan memenuhi syarat dalam  
memperoleh gelar sarjana Sains pada Departemen Biologi Fakultas  
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin*



**LARAYANTI**

**H411 12 901**

**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2017**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**KRIOPRESERVASI SEMEN IKAN BARONANG *Siganus guttatus*  
MENGUNAKAN BEBERAPA JENIS LARUTAN EXTENDER**

**LARAYANTI**

**H411 12 901**

**Disetujui Oleh**

**Pembimbing Utama,**



**Dr. Irma Andriani, S.Pi, M. Si**  
**NIP.19710809 199902 2 002**

**Pembimbing Pertama,**



**Dr. Eddy Soekendarsi, M.Sc**  
**NIP. 19560526 198702 1 001**

**Pembimbing Kedua**



**Dr. Asda Laining, M.Sc**  
**NIP. 197109241999032004**

**Makassar, 1 November 2017**

## KATA PENGANTAR

*Assalamu 'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh*

*Alhamdulillah robbil'alamiin* segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT dan junjungan kita Nabi Muhammad SAW atas segala rahmat, hidayah dan karunia-Nya serta nikmat yang diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kriopreservasi sel sperma Ikan baronang *Siganus guttatus* menggunakan beberapa jenis larutan Extender ”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Penegetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar.

Terima kasih yang tak terhingga dan mendalam, penulis sampaikan kepada Ibu Dr. Irma Andriani, S.Pi., Dr. Eddy Soekendarsi, M.Sc dan Dr. Asda Laining, M.Sc yang telah meluangkan waktu ditengah kesibukan beliau dan memberikan arahan, dorongan, semangat, motivasi dan senantiasa sabar dalam membimbing penulis hingga skripsi ini selesai.

Berbagai kendala penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini. Namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melalui kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

- Ibu Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA beserta seluruh staf.

- Bapak Dr. Eng. Amiruddin, S.Si, M.Si selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
- Ibu Dr. Hj. Zohra Hasyim, M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, beserta staf.
- Tim dosen penguji, Ibu Dr. Hj. Zohra Hasyim, M.Si, ibu Dr. Hj. A. Masniawati, M.Si, bapak Drs. As'adi Abdullah, M.Si, dan Ibu Dr. Syahribulan, M.Si.
- Ibu Dr. Irma Andriani, S.Pi, M.Si. selaku Penasehat Akademik (PA), yang senantiasa mengontrol dan membimbing penulis dari awal hingga akhir masa studi.
- Bapak/Ibu Dosen dan pegawai Jurusan Biologi yang senantiasa membantu penulis sehingga dapat mencapai gelar sarjana.
- Rekan penelitian dan teman-teman yang membantu penulis selama penelitian dan pengerjaan tugas akhir penulis.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang membutuhkannya untuk kemajuan dan perkembangan dunia sains.

Makassar, Desember 2017

Penulis

## ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh perbedaan extender terhadap viabilitas sel sperma ikan Baronang *Siganus guttatus*. 4 perlakuan yang berbeda dengan menggunakan kombinasi antara DMSO 10 % dan larutan Ringer, DMSO 10% dan larutan glukosa, DMSO 10 % tanpa extender serta sel sperma tanpa DMSO 10 % dan extender sebagai kontrol negatif. Sel sperma diperoleh dari gonad jantan *Siganus guttatus* yang telah distripping. Sel sperma tersebut diencerkan dengan extender dengan rasio 1: 9. Sel sperma disimpan dalam cryotube kemudian dimasukkan ke dalam Bisel Biofreezing Vessel lalu disimpan dalam freezer suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam lalu selanjutnya dipindahkan ke dalam freezer dengan suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  selama 20 jam kemudian dipindahkan kedalam nitrogen cair. Satu minggu kemudian sel sperma diencerkan kembali (Thawing) dengan cara menggosok cryotube pada telapak tangan selama 20 detik. Presentase rata-rata viabilitas sel sperma pasca thawing tertinggi dihasilkan pada kombinasi extender glukosa dan DMSO 10 % yaitu 7,10. Sementara itu rata-rata viabilitas sel sperma yang menggunakan ringer sebagai extender yaitu 4,68. Hasil penelitian ini menunjukkan penggunaan glukosa sebagai extender lebih efektif digunakan pada kriopreservasi sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus*.

Kata kunci : kriopreservasi, *Siganus guttatus*, sel sperma

## ABSTRACT

This research was conducted to look at the influence of difference in viability of sperm cells against extender fish Rabbitfish *Siganus guttatus*. 4 treatment different using a combination of DMSO 10 % and solution ringer, DMSO 10 % and solution glucose, DMSO 10 % without extender and sperm cells without DMSO 10 % and extender as control negative. The sperm cell in gathered from the gonads male *siganus guttatus* that has been in stripping. Sperm cells are encerkan with extender with ratio 1: 9. Sperm cells stored in the cryotube then enter into the last Vessel in the Bisel Biofreezing store in freezer temperature of -20 °C for 1 hour and then move on to the next in the freezer with a temperature -80 °C for 20 hours later on the move into liquid nitrogen. One week later the sperm cells in dilute (Thawing) by way of rubbing the cryotube on hands for 20 seconds. The average percentage of the viability of sperm cells generate highest post-thawing on a combination of glucose and extender DMSO 10% is 7,10. While the average viabilitas a sperm cell that use ringer as extender namely 4,68. The result of this research shows the use of glucose as extender more effective used on cryopreservation of sperm cell of rabbit fish *siganus guttatus*.

Keywords : Cryopreservation, *Siganus guttatus*, Sperm cells

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
I.1. Latar Belakang .....	1
I.2. Tujuan Penelitian .....	3
I.3. Manfaat Penelitian .....	3
I.4. Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
II.1 Ikan Baronang <i>Siganus guttatus</i> .....	4
II.2 Taksonomi dan Morfologi Ikan Baronang <i>Siganus guttatus</i> .....	4

II.3. Kriopreservasi .....	7
II.3.1 Teknik Kriopreservasi .....	7
II.3.2 Metode Kriopreservasi.....	10
II.4. Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kriopreservasi .....	12
II.5. Krioprotektan dan Extender pada Kriopreservasi.....	13
II.5.1 Defenisi dan Bahan Krioprotektan.....	13
II.5.2 Defenisi dan Jenis-jenis Extender.....	14
II.6 Faktor yang mempengaruhi Penurunan Viabilitas Sel Sperma selama proses Kriopreservasi.....	17
II.6.1 Kejutatan Dingin.....	18
II.6.2 Pembentukan Kristal Es.....	18
II.6.3 Peroksidasi Lipid .....	20
II.6.4 Faktor Anti beku pada Plasma Semen .....	21
<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
III.1. Alat.....	23
III.2. Bahan.....	23
III.3. Tahapan Penelitian .....	23
III.3.1. Pemeliharaan Dan Pengambilan Sperma Ikan Baronang <i>Siganus</i> <i>guttatus</i> .....	24
III.3.2. Isolasi Sel Sperma.....	24
III.3.3. Kriopreservasi Sel Sperma Ikan baronang <i>Siganus guttatus</i> .....	24
III.3.4. Pengamatan terhadap jumlah dan viabilitas sel testicular sebelum dan setelah kriopreservasi.....	26

III.3.5. Rancangan Percobaan dan Analisis data.....	26
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>27</b>
IV.1. Isolasi Sel Sperma Ikan baronang <i>Siganus guttatus</i> .....	27
IV.2. Kriopreservasi Sel Sperma ikan baronang <i>Siganus guttatus</i> .....	29
IV.3. viabilitas sel sperma ikan baronang <i>Siganu sguttatus</i> sebelum dan setelah kriopreservasi.....	29
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
V.1. Kesimpulan .....	36
V.2. Saran.....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN 1.....</b>	<b>40</b>
<b>LAMPIRAN 2.....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN 3.....</b>	<b>45</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.</b>	Beberapa extender yang digunakan untuk kriopreservasi sperma pada berbagai jenis ikan.....	16
<b>Tabel 2.</b>	Efek penggunaan larutan extender yang berbeda pada motilitas, fertilisasi dan kecepatan pemijahan pada sperma ikan koi carp....	17
<b>Tabel 3.</b>	Perbandingan jumlah viabilitas sel sperma sebelum dan setelah kriopreservasi.....	3
<b>Tabel 4.</b>	Hasil Analisis varian terhadap viabilitas sel sperma pasca kriopreservasi.....	4
<b>Tabel 5.</b>	Hasil Uji BNT terhadap rata-rata viabilitas sel sperma ikan baronang <i>Siganus guttatus</i> pasca kriopreservasi.....	32

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b> Morfologi Ikan Baronang <i>Siganus guttatus</i> .....	5
<b>Gambar 2.</b> Sperma ikan baronang <i>Siganus guttatus</i> .....	27
<b>Gambar 3.</b> Sel sperma ikan Baronang <i>Siganus guttatus</i> hasil pengamatan sel hidup dan mati .....	28

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Data hasil perhitungan kepadatan dan viabilitas sel sperma sebelum dan setelah kriopreservasi dengan 4 perlakuan yang berbeda.....	40
<b>Lampiran 2.</b> Data hasil perhitungan Analisis varian (ANOVA) dan Tabel Hasil viabilitas sel sperma ikan baronang <i>Siganus guttatus</i> pasca kriopreservasi.....	40
<b>Lampiran 3.</b> Data hasil Uji BN.....	45
<b>Lampiran 4.</b> Foto Tahapan – tahapan Penelitian.....	4

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Produksi benih ikan laut pada umumnya dan ikan baronang pada khususnya masih tergantung pada stok di alam. Adanya ketergantungan ini sangat rawan bagi kebutuhan budidaya secara kontinyu, sehingga perlu adanya alternatif lain dengan membuat pembenihan secara buatan. Selama ini ikan baronang baru dikembangkan di Indonesia sehingga jumlah dan kuantitas benih belum memadai. Perkembangan budidaya ikan sangat dipengaruhi oleh teknologi pembenihan, terutama dalam pengadaan benih ikan. Sering kali timbul masalah dalam pengadaan benih yang dikarenakan masa pematangan gamet induk ikan jantan dan betina tidak terjadi secara bersamaan, salah satu cara untuk memberikan alternatif pemecahan dalam masalah tersebut melalui penerapan bioteknologi reproduksi yaitu pengawetan sperma (Gazali dan Surya, 2002). Pengawetan sperma bertujuan dalam mengoptimalkan induk jantan yang unggul dalam membuahi sel telur betina yang sejenis sehingga pengawetan sperma mempunyai peran yang sangat besar dalam penyediaan benih ikan unggul.

Saat ini ada  $\pm$  200 spesies ikan di dunia yang berhasil diawetkan semennya menggunakan teknik kriopreservasi (Gazali dan Surya, 2002). Di antaranya ikan mas *Cyprinus carpio* (Kurokura *et al.*, 1984) dan ikan salmon Atlantik *Salmo salar* (Stoss dan Refstie, 1983). Dasar pemilihan jenis extender untuk pembekuan sel sperma selain mengandung bahan yang bekerja melindungi sel pada saat pembekuan juga harus mempunyai bobot molekul yang kecil agar lebih mudah dan cepat penetrasi ke dalam sel, sehingga mengurangi toksisitas

akibat osmolaritas yang tinggi; dan mudah larut dalam air (Alvarenga *et al.*, 2005).

Teknologi kriopreservasi khususnya pada sel-sel bakal gamet seperti spermatogonia maupun oogonia spesies yang terancam punah pun berpeluang untuk dihidupkan kembali dan dapat disimpan dalam waktu yang lama untuk digunakan pada saat diinginkan. Saat ini teknologi kriopreservasi sel gamet spermatozoa (semen) sangat banyak digunakan dan untuk itu diperlukan teknologi fertilisasi buatan atau inseminasi buatan (Gazali dan Surya, 2002).

Pembenihan ikan baronang *Siganus guttatus* sekarang sudah berkembang di beberapa negara termasuk Indonesia. Namun pembenihan ikan baronang *Siganus guttatus* umumnya masih sebatas pemijahan alami yang hasilnya tidak terjadi atau sangat rendah, walaupun terjadi perkawinan tingkat fertilitas telur sangat rendah (telur tidak fertil) dan fekunditas (jumlah telur) serta kualitas spermatofor rendah (bening). Meskipun telah tersedia pembenihan ikan baronang *Siganus guttatus* namun hingga kini upaya kearah konservasi melalui kriopreservasi belum dilakukan. Pentingnya upaya konservasi ini adalah untuk mengembangkan model penyelamatan melalui koleksi materi biologi seperti sel sperma untuk penyimpanan jangka waktu yang sangat lama. Namun sebelum sampai pada tujuan tersebut, pengembangan standar larutan extender perlu diuji untuk kesesuaian sifat spesifik sperma sesuai jenis satwanya. Larutan extender berfungsi melindungi sel sperma terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat dan juga menjadi sumber energi. Pemakaian bahan pengencer bertujuan untuk mengurangi aktifitas spermatozoa sehingga menghambat pemakaian energi dan memperpanjang hidup sperma (Alvarenga *et al.*, 2005).

Keberhasilan suatu proses kriopreservasi biasanya ditentukan oleh beberapa hal, di antaranya adalah jenis larutan ekstender yang digunakan. Namun belum didapatkan referensi tentang adanya kriopreservasi yang dilakukan pada sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus*. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian tentang kriopreservasi semen ikan baronang *Siganus guttatus* perlu dilakukan dan sebagai perlakuan pada penelitian ini akan diamati pengaruh beberapa jenis larutan ekstender.

## **I.2 Tujuan Penelitian**

Mengetahui pengaruh beberapa jenis larutan ekstender terhadap viabilitas sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* pasca kriopreservasi.

## **I.3 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan mampu menjadi upaya awal konservasi plasma nutfah ikan-ikan endemik dan hampir punah di Indonesia. Metode kriopreservasi pada penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi informasi yang bermanfaat bagi peneliti yang berkecimpung di bidang konservasi.

## **I.4 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan september 2017 di Laboratorium Bioteknologi, di Hatchery Instalasi Pembenihan Balai Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya Air Payau yang berlokasi di Lawallu, Kabupaten Barru.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Ikan Baronang *Siganus guttatus*

#### II.2 Taksonomi dan Morfoogi Ikan Baronang *Siganus guttatus*

Ikan baronang *Siganus guttatus* Bloch 1787 merupakan anggota famili Siganidae yang mempunyai badan pipih dan mulut kecil. Ikan ini bernama umum spotted rabbitfish atau baronang tutul karena memiliki bercak kuning cerah dekat ujung sirip punggung dan tubuh yang berbintik-bintik kuning hingga orange. Jenis ikan baronang tutul tergolong berukuran besar, yaitu dapat mencapai 1 kg per ekor (Watson, 2000). Menurut Ayson *et al.* (2014), ikan baronang *Siganus guttatus* termasuk ikan nokturnal atau aktif pada malam hari. Ikan baronang *Siganus guttatus* hidup di perairan pesisir tropis hingga subtropis di Samudera Hindia dan Pasifik Barat (Gundermann *et al.* 1983).

Habitat ikan baronang di sekitar ekosistem terumbu karang, lamun, mangrove, dan estuari ekor (Watson, 2000) dengan kisaran kedalaman 3-50 m (Fishbase, 2001) dan umumnya di kedalaman kurang dari 15 m ekor (Watson, 2000). Salah satu wilayah penyebaran ikan baronang tutul di perairan Indonesia adalah perairan Kepulauan Seribu ekor (Watson, 2000).

Klasifikasi ikan baronang menurut Watson (2000) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phyllum	: Chordata
Class	: Pisces
Ordo	: Perciformes
Family	: Siganidae
Genus	: <i>Siganus</i>
Species	: <i>Siganus guttatus</i>



Gambar 1.1 Morfologi Ikan baronang *Siganus guttatus*

Tubuh ikan baronang *Siganus guttatus* lebar dan pipih, ditutupi oleh sisik-sisik halus dengan warna yang bervariasi, warna umumnya kecoklatan sampai kehijau-hijauan. Pada bagian punggung terdapat bintik putih, coklat, kelabu, atau emas, sedangkan di bagian perut kadang-kadang bintik tersebut kabur dan kehitaman seperti garis-garis. Di bagian belakang tutup insang sebelah atas titik-titik ini berwarna hitam atau hilang sama sekali. Warna ikan baronang dapat berubah-ubah dengan cepat sesuai dengan kondisi lingkungan dan untuk menghindari diri dari bahaya (kamufase). Ikan baronang yang hidup di alam mempunyai warna tubuh yang terang atau cerah sedangkan ikan baronang yang hidup ditambak mempunyai warna tubuh yang suram (seperti air tambak), ikan baronang mempunyai duri-duri yang beracun yang terdapat pada 13 duri keras sirip punggung, 4 duri keras sirip perut, dan 7 duri keras sirip dubur (Alvarenga *et al.*, 2005).

Sesuai dengan morfologi gigi dan saluran pencernaannya yaitu mulutnya kecil, mempunyai gigi seri pada masing-masing rahang, gigi geraham berkembang sempurna, dinding lambung agak tebal, usus halusanya agak panjang

dan mempunyai permukaan yang luas, ikan baronang termasuk herbivora, namun bila dibudidayakan ikan ini mampu memakan makanan apa saja yang diberikan seperti pakan buatan (Freshney, 2005). Ikan baronang *Siganus guttatus* adalah jenis ikan yang umum ditemukan di daerah padang lamun. Beberapa penelitian melaporkan bahwa ikan baronang adalah ikan herbivora yang dapat memakan lamun. Ikan baronang *Siganus guttatus* memiliki panjang mencapai 23 cm, lebar badan antara 2,4-2,7 kali dari panjang standar dengan badan yang berbentuk oval dan menyamping. Badannya berwarna kecoklat-coklatan dengan bintik-bintik putih yang tersebar di seluruh tubuh.

Ikan baronang *Siganus guttatus* pada umumnya memiliki habitat di lingkungan perairan terumbu karang yang banyak tumbuhan lautnya dan di daerah padang lamun (seagrass), namun ciri-ciri khusus tersebut berbeda-beda antar spesies. Ikan baronang *Siganus guttatus* biasanya hidup di daerah yang berumput di padang lamun dan hutan-hutan mangrove sebagai daerah asuhan dan pembesaran, dan saat dewasa akan menuju ekosistem di sekitarnya seperti terumbu karang untuk menghabiskan sebagian masa dewasanya pada ekosistem tersebut. Ikan ini dapat beradaptasi dari habitat satu ke habitat lain yang kondisi lingkungannya berbeda, seperti dari air laut yang bersalinitas tinggi (lebih dari 30 ppt) ke perairan payau (10-20 ppt). Walaupun baronang dapat mentoleransi perubahan salinitas yang cukup luas, tetapi sangat sensitif pada perubahan yang drastis. Ikan baronang dapat mentolerir dan beradaptasi dengan baik bila perubahan terjadi secara perlahan-lahan. Selain salinitas ikan baronang juga sangat sensitif terhadap perubahan suhu dan oksigen yang drastis. Oksigen di

bawah 2,0 ppt dapat membuat baronang steris dengan kisaran suhu 28-32 °C (Alvarenga *et al.*, 2005).

## **II.3 Kriopreservasi**

### **II.3.1 Teknik Kriopreservasi**

Teknik kriopreservasi merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan ataupun materi genetika lain (termasuk semen) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologis, biologis, dan morfologis tetap ada. Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan yang dilakukan pada suhu yang sangat rendah (-196 °C) dalam nitrogen cair (Boediono, 2003). Teknik kriopreservasi juga sebagai faktor pendukung tambahan yang sangat baik untuk konservasi *in situ* dan mungkin juga digunakan dalam program seleksi (Danchinburge dan Hiemstra, 2003).

Kriopreservasi sel spermatozoa dibedakan atas pembekuan lambat (slow freezing), pembekuan cepat (rapid freezing), dan pembekuan sangat cepat (ultra rapid freezing). Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati. Perhatian harus difokuskan pada prinsip perpindahan air keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum deep freezing maupun rehidrasi pada saat pencairan kembali (thawing) (Gazali dan Surya, 2002).

Teknik kriopreservasi dapat dibedakan atas teknik kriopreservasi konvensional (*conventional slowfreezing*) dan kriopreservasi secara cepat (*rapidfreezing*). Teknik kriopreservasi konvensional adalah teknik kriopreservasi yang lebih menekankan pada proses pembekuan lambat. Pada teknik ini, suhu diturunkan secara bertahap dengan mesin pendingin yang dapat diprogram. Dengan teknik ini kristal es masih terbentuk, baik ekstraseluler maupun intraseluler, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Hal ini disebabkan oleh elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (Watson, 2000).

Teknik ini selain melibatkan proses pemaparan krioprotektan baik pada saat pra-pembekuan dan pasca *thawing* (pencairan kembali) yang bertahap, juga melibatkan proses pembekuan bertahap dengan menekankan pentingnya proses *seeding*. Proses *seeding* dimaksudkan untuk menginisiasi pembentukan kristal es sebagai inti es dengan menurunkan suhu sebagian larutan, agar dehidrasi terjadi dan menekan pelepasan energi panas yang berlebihan dari fusi kristal es. Inisiasi secara mendadak ini dilakukan pada temperatur sedikit di bawah titik beku larutan, sehingga dapat mencegah peningkatan derajat *supercooling* atau memperpendek selang *supercooling*. Tanpa perlakuan *seeding*, inti es akan terbentuk secara spontan pada temperatur  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  (fenomena *supercooling*) yang disertai dengan pelepasan fusi panas, sehingga suhu hampir mencapai titik bekunya kembali. Kondisi ini akan menimbulkan suatu fluktuasi temperatur yang cukup besar. Teknik kriopreservasi konvensional juga disebut

dengan teknik pembekuan dua tahap. Teknik pembekuan dua tahap meliputi inkubasi sel dalam krioprotektan dengan total konsentrasi 1-2 M yang menyebabkan dehidrasi moderat dan diikuti oleh pembekuan lambat, misalnya dengan kecepatan 1°C / menit hingga suhu -35°C, lalu pembekuan dalam nitrogen cair dan *thawing* untuk evaluasi.

Teknik kriopreservasi cepat adalah proses pemadatan konsentrasi krioprotektan (ekstraseluler maupun intraseluler). Pada teknik ini, sebagian besar air di dalam sel dikeluarkan sebelum terjadi pembekuan intraseluler dan digantikan dengan krioprotektan, sehingga pada saat pembekuan tidak terjadi kristal es (Valerdi *et al.*, 2009). Prosesnya meliputi (a) dehidrasi, yaitu proses pergantian cairan sitoplasma dengan larutan krioprotektan melalui proses difusi ke dalam sel; (b) pembekuan, tahapan pada saat sel atau organ dan larutan berada dalam nitrogen cair (-196°C) membentuk padatan *solid glass*; (c) *warming*, yaitu tahap terjadinya perubahan kembali bentuk padatan menjadi cair; serta (d) rehidrasi, yaitu proses masuknya kembali air ke dalam sel untuk menggantikan kedudukan krioprotektan.

Setiap teknik kriopreservasi mempunyai kelebihan dan kekurangan. Kelebihan dari kriopreservasi secara umum adalah (1) bahan atau materi dapat disimpan dalam waktu tidak terbatas; (2) dapat dikoleksi setiap saat; (3) dapat digunakan kapan saja bila dibutuhkan; (4) melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan; (5) tidak perlu mengimpor atau memelihara pejantan-pejantan unggul; (6) tidak membutuhkan ruangan yang besar karena tabung nitrogen cair cukup memadai untuk menyimpan bahan dalam ragam dan jumlah yang banyak; dan (7) tidak menyebabkan perubahan material genetik yang

disimpan dalam proses kriopreservasi. Sementara itu, kekurangannya adalah (1) biaya pelaksanaan cukup mahal; (2) memerlukan tenaga yang terampil dan berpengalaman; (3) nitrogen cair perlu tersedia secara kontinyu; dan (4) hanya semen yang berkualitas baik yang dapat dan layak dibekukan (Toelihere, 1985).

### **II.3.2 Metode Kriopreservasi**

Metode kriopreservasi sel spermatozoa dibedakan atas pembekuan lambat (slow freezzing), pembekuan cepat (rapid freezing), dan pembekuan sangat cepat (ultra rapid freezing). Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati. Perhatian harus difokuskan pada prinsip perpindahan air keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum deep freezing maupun rehidrasi pada saat pencairan kembali (thawing) (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Teknik kriopreservasi dapat dibedakan atas teknik kriopreservasi konvensional dan kriopreservasi secara cepat. Teknik kriopreservasi konvensional adalah teknik kriopreservasi yang lebih menekankan pada proses pembekuan lambat. Pada teknik ini, suhu diturunkan secara bertahap dengan mesin pendingin yang dapat diprogram. Dengan teknik ini kristal es masih terbentuk, baik ekstraseluler maupun intraseluler, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel (Kostaman dan Setioko, 2011).

Teknik kriopreservasi konvensional juga disebut dengan teknik pembekuan dua tahap. Teknik pembekuan dua tahap meliputi inkubasi sel dalam

krioprotektan dengan total konsentrasi 1-2 M yang menyebabkan dehidrasi moderat dan diikuti oleh pembekuan lambat, misalnya dengan kecepatan 1°C/menit hingga suhu -35°C, lalu pembekuan dalam nitrogen cair dan thawing untuk evaluasi (Kostaman dan Setioko, 2011).

Teknik kriopreservasi cepat adalah proses pemadatan konsentrasi krioprotektan (ekstraseluler maupun intraseluler). Pada teknik ini, sebagian besar air di dalam sel dikeluarkan sebelum terjadi pembekuan intraseluler dan digantikan dengan krioprotektan, sehingga pada saat pembekuan tidak terjadi kristal es (Linhart *et al.*, 2000). Prosesnya meliputi (a) dehidrasi, yaitu proses pergantian cairan sitoplasma dengan larutan krioprotektan melalui proses difusi ke dalam sel; (b) pembekuan, tahapan pada saat sel atau organ dan larutan berada dalam nitrogen cair (-196°C) membentuk padatan solid glass; (c) warming, yaitu tahap terjadinya perubahan kembali bentuk padatan menjadi cair; serta (d) rehidrasi, yaitu proses masuknya kembali air ke dalam sel untuk menggantikan kedudukan krioprotektan (Kostaman dan Setioko, 2011).

Setiap teknik kriopreservasi mempunyai kelebihan dan kekurangan. Kelebihan dari kriopreservasi secara umum adalah (1) bahan atau materi dapat disimpan dalam waktu tidak terbatas; (2) dapat dikoleksi setiap saat; (3) dapat digunakan kapan saja bila dibutuhkan; (4) melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan; (5) tidak perlu mengimpor atau memelihara pejantan-pejantan unggul; (6) tidak membutuhkan ruangan yang besar karena tabung nitrogen cair cukup memadai untuk menyimpan bahan dalam ragam dan jumlah yang banyak; dan (7) tidak menyebabkan perubahan material genetik yang disimpan. Sementara itu, kekurangannya adalah (1) biaya pelaksanaan cukup

mahal; (2) memerlukan tenaga yang terampil dan berpengalaman; (3) nitrogen cair perlu tersedia secara kontinu; dan (4) hanya semen yang berkualitas baik yang dapat dan layak dibekukan (Toelihere, 1985).

#### **II.4 Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kriopreservasi**

Keberhasilan teknik kriopreservasi ditentukan oleh (1) Jenis larutan ekstender (pengencer); (2) jenis dan konsentrasi krioprotektan; (3) rasio pengenceran; dan (4) laju pembekuan dan pencairan kembali (Barcelo-Fimbres *et al.*, 2007). Jika pembekuan terlalu lambat maka air akan banyak keluar dari sel untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi air intraseluler dan ekstraseluler serta terjadi dehidrasi untuk menghindari pembekuan intraseluler. Apabila media pengencer didinginkan di bawah tingkat pendinginan maka kristal es menggumpal dan air akan mengalami pengkristalan keluar sebagai es (Watson, 2000).

Jika pembekuan yang terjadi terlalu cepat sel akan terdehidrasi terlalu kuat dan dapat menyebabkan terjadinya plasmolisis yang sama kuatnya sehingga menyebabkan perubahan pH, interaksi mikromolekuler dan peningkatan pelelehan, tekanan osmotik menyebabkan vesikula irreversibel yang mengakibatkan sel akan menjadi lisis. Pada derajat penurunan suhu yang sangat cepat maka akan terbentuk kristal es yang halus di dalam sel yang mempunyai energi permukaan yang besar dan tidak stabil serta cenderung membentuk kristal es yang besar. Kondisi ini akan mengakibatkan kerusakan dan kematian sel (Parks dan Graham, 1992).

## **II. 5 Krioprotektan dan Extender pada Kriopreservasi**

### **II.5.1 Defenisi dan Bahan Krioprotektan**

Krioprotektan ialah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat di pertahankan. Berdasarkan cara kerjanya krioprotektan dikelompokkan mejadi ;penetrating (bekerja di dalam dan di luar sel), seperti etilen glikol dan propilen glikol (Chen *et al.*, 2005, Chao 1991) dan non-penetrating (hanya di luar sel), seperti sukrosa, glukosa, atau fruktosa (Diez *et al.*, 2001, Barcelo-Fimbres dan Seidel, 2007).

Penambahan krioprotektan bertujuan untuk memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi. Kemampuan proteksi krioprotektan terhadap membran sel merupakan indikasi dari interaksi yang berjalan baik antara krioprotektan dan membran sel. Interaksi ini dapat mengurangi kerusakan membran sel pada saat terjadi perubahan keadaan dari relatif cair ke struktur relatif padat dan juga pada saat kembali ke struktur yang relatif cair selama proses pencairan (Kostaman dan Setioko, 2011).

Sementara itu, berdasarkan bahan yang terkandung di dalamnya krioprotektan dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu kelompok alkohol (etilen glikol, gliserol, dan lain-lain) dan kelompok amida (dimetilformamid, asetamid, metilformamid, dan lain-lain). Dasar pemilihan jenis krioprotektan untuk pembekuan semen menurut Muchlisin (2005) dan Alvarenga *et al.* (2005) selain mengandung bahan yang bekerja melindungi sel pada saat pembekuan juga

harus mempunyai bobot molekul yang kecil agar lebih mudah dan cepat penetrasi ke dalam sel, sehingga mengurangi toksisitas akibat osmolaritas yang tinggi; dan mudah larut dalam air. Pengaruh krioprotektan dalam melindungi spermatozoa pada saat kriopreservasi selain dari cara kerjanya, juga dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasinya.

Krioprotektan yang umum digunakan pada pembekuan semen adalah dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMA), dan gliserol. DMSO adalah campuran organosulfur dengan rumus kimia  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  dan mempunyai berat molekul sebesar 78,13. DMSO adalah suatu bahan pelarut polar aprotik yang penting. DMSO juga dikenal sebagai krioprotektan konvensional yang ditambahkan ke media sel untuk mencegah kematian sel sepanjang proses pembekuan. Titik beku DMSO tinggi, pada suhu kamar merupakan suatu padatan yang dapat membatasi kegunaannya dalam beberapa proses kimia (seperti kristalisasi pada waktu cooling (Kostaman dan Setioko, 2011)).

## **II.5.2 Defenisi dan Jenis- Jenis Extender**

Bahan pengencer untuk menjamin terpenuhinya kebutuhan fisik dan kimia sehingga spermatozoa dapat mempertahankan kelangsungan hidupnya selama proses kriopreservasi perlu ditambahkan bahan pengencer. Secara umum bahan pengencer terdiri atas tiga bagian, yaitu (i) bahan dasar, seperti kuning telur, air kelapa, air susu; (ii) bahan penyanggah, seperti natrium kalium bikarbonat, asam sitrat, tris; dan (iii) bahan tambahan, seperti gliserol dan antibiotika (Toelihere, 1985).

Fungsi bahan pengencer ialah merupakan sumber energi, melindungi sperma terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat, mencegah pengaruh yang merugikan seperti perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, menghambat pertumbuhan bakteri, meningkatkan volume semen sehingga dapat digunakan untuk inseminasi dan memproteksi sel spermatozoa selama pembekuan (Hafez, 2000).

Beberapa jenis bahan pengencer yang sering digunakan dalam pembekuan semen hewan mamalia antara lain ialah glukosa, laktosa, sakarosa, sitrat, susu skim, dan tris. Glukosa, laktosa, dan sakarosa merupakan sumber energi sehingga spermatozoa tetap bertahan hidup selama proses pembekuan. Sitrat berperanan sebagai komponen penyangga sehingga dapat mempertahankan pH semen secara fisiologi. Susu skim memiliki kelebihan sebagai media isotonik dan anti kejutan dingin karena banyak mengandung komponen yang menguntungkan untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa (Kostaman dan Setioko, 2011).

Ikan menghasilkan sperma dengan viskositas yang tinggi dan dalam beberapa kasus hanya sedikit yang diproduksi. Extender berperan penting dalam kriopreservasi, dibutuhkan untuk pengenceran sperma, dan umumnya menginduksi motilitas awal dan meningkatkan fertilisasi pada sperma yang dikriopreservasi. Telah diketahui bahwa spermatozoa dapat diawetkan selama sehari hingga bertahun-tahun dan pergerakan mereka dapat dipertahankan di bawah suhu rendah (Muhlizin, 2005).

Ringer dan larutan fisiologis adalah extender yang umum digunakan karena larutan ini mudah untuk dipersiapkan. Suatu larutan fisiologis dapat mengandung 7.98 g/L NaCl dan 0,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Alawi *et al.*, 1995) sedangkan larutan ringer mengandung 7,5 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,20 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,20 g / L NaHCO<sub>3</sub>. Ringer umumnya digunakan pada spermatozoa ikan air tawar. Namun, larutan ringer yang telah dimodifikasi juga dapat digunakan pada ikan air aut dengan komposisi 13,5 g / l NaCl, 0,60 g / l KCl, 0,25 g / l CaCl<sub>2</sub>, 0,35 g / l MgCl<sub>2</sub>, dan 0,2 g / l NaHCO<sub>3</sub>. Ringer dengan susu dan ringer dengan madu juga dilaporkan cocok digunakan pada ikan nila *Oreochromis niloticus* dan bandeng *Chanos chanos* atau porgy hitam *Acanthopagrus Schlegeli* (Chao, 1991).

Extender lain yang dapat digunakan adalah larutan garam terdiri dari 75 mmol / L NaCl, 70 mmol / L KCl, 2 mmol CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol / L MgSO<sub>4</sub>, dan 20 mmol / L tris (pH 8) yang cocok untuk spermatozoa ikan cyprinidae (Lahnsteiner *et al.*, 2000). Selain itu, Kurokura-1 yang mengandung 128,4 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub> adalah cocok untuk ikan mas (*Cyprinus carpio*) spermatozoa (Linhart, *et al.*, 2000).

**Tabel 1.** Beberapa extender yang digunakan untuk kriopreservasi sperma pada berbagai jenis ikan (Chao, 1996).

Ingredient (g/L)	NaCl	KCL	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	Taps	Caps	Glucose	Yolk	Honey	Milk	Species Recommended
	(g/L)					(mmol)			(ml)			
Marine fish ringer	13,5	0,6	0,25	0,35	0,2	-	-	-	-	-	-	Marine fish
Freshwater fish ringer	7,5	0,2	0,20	-	0,2	-	-	-	-	-	-	Freshwater
Taps	2,9	3,2	0,07	0,03	-	15	-	-	-	-	-	Tilapia
Caps	2,9	3,2	0,07	0,03	-	-	15-	-	-	-	-	Tilapia
Milk in ringer	7,5	0,2	0,20	-	0,2	-	-	-	-	-	150	Tilapia
V <sub>2e</sub>	7,5	0,38	-	-	2,0	-	-	1,0	0,2	-	-	Tilapia
V <sub>2f</sub>	7,5	-	-	-	2,0	-	-	1,0	0,2	-	-	Black porgy,
Honey in ringer	7,5	0,6	0,60	0,35	0,2	-	-	-	-	1	-	Milkfresh

Pada beberapa penelitian telah ditemukan bahwa perbedaan jenis dan konsentrasi larutan ekstender yang digunakan juga mempengaruhi motilitas sperma setelah thawing. Kriopreservasi yang dilakukan pada Mekong giant catfish (MGC) di Thailand dengan menggunakan 4 jenis larutan ekstender yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan pada kemampuan sperma tersebut untuk bertahan hidup.

Penelitian yang dilakukan pada ikan koi carp *Cyprinus carpio* dengan menggunakan 3 jenis ekstender yang berbeda juga ditemukan perbedaan motilitas sperma saat thawing serta perbedaan kecepatan fertilisasi.

**Tabel 2.** Efek penggunaan larutan ekstender yang berbeda pada motilitas, fertilisasi dan kecepatan pemijahan pada sperma ikan koi carp (Bozkurt, 2012).

Extender	Motilitas (%)	Kecepatan Pemijahan (%)	Fertilisasi (%)	Tingkat Penetasan (%)
E1	7,5±0,4a	27,5±1,2a	99,6±0,5	42,5±1,9b
E2	78,6±0,7b	32,9±0,4b	99,7±0,5	46,2±0,7c
E3	72,3±0,2a	25,2±0,6a	98,3±1,2	37,4±0,2a
Kontrol	-	-	99,8±0,2	86,2±0,4d

## II.6 Faktor yang Mempengaruhi Penurunan Viabilitas Sel Sperma Selama Proses Kriopreservasi

Ada dua faktor utama selama proses kriopreservasi sel spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal es. Selain itu ada beberapa faktor tambahan, yaitu peroksidasi lipid dan faktor antibeku pada plasma semen seperti egg-yolk coagulating enzyme, trigliserol lipase, dan faktor antimotilitas (Gazali dan Surya, 2002).

### **II.6.1 Kejutatan Dingin.**

Kejutatan dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak pada suhu tubuh sampai di bawah 0°C yang akan menurunkan viabilitas sel. Fenomena kejutatan dingin pada sel belum diketahui secara jelas, akan tetapi kemungkinan berkaitan dengan tahap transisi dari membran lipid yang menyebabkan terjadinya tahap pemisahan dan penurunan sifat-sifat permeabilitas secara selektif dari membran biologi sel hidup (Watson, 2000).

Tingkat sensitivitas sel terhadap kejutatan dingin dipengaruhi oleh tingkat pendinginan dan interval suhu (Watson, 2000). Dua tipe kerusakan pada sel akibat kejutatan dingin dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung yang bersifat laten (Amann, 1999). Kerusakan langsung akan mempengaruhi struktur dan fungsi seluler, misalnya penurunan proses metabolisme spermatozoa, sedangkan kerusakan tidak langsung sulit untuk diamati dan baru terlihat setelah proses pencairan kembali. Pengaruh utama dari kejutatan dingin terhadap sel spermatozoa ialah penurunan motilitas dan daya hidup, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Jumlah spermatozoa motil mengalami penurunan disertai pelepasan enzim, perpindahan ion melewati membran, dan penurunan kandungan lipid seperti fosfolipid dan kolesterol yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas struktur membran plasma (Weitze dan Petzoldt, 1992, White, 1993) serta penurunan kemampuan sel spermatozoa untuk mengontrol aliran  $Ca^{2+}$  (Bailey dan Buhr, 1994).

### **II.6.2 Pembentukan Kristal Es**

Pembentukan kristal es selama proses kriopreservasi sel spermatozoa menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit di dalam sel. Hal tersebut

mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik. Elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (Watson, 2000).

Perubahan fisik di dalam sel selama kriopreservasi berkaitan dengan derajat penurunan suhu. Prinsip utama dari derajat penurunan suhu ialah kecepatan optimum yang dapat memberi kesempatan air keluar dari sel secara kontinu bertahap sebagai respons sel terhadap kenaikan konsentrasi larutan ekstraseluler yang semakin tinggi di antara kristal es yang terbentuk. Jika derajat penurunan suhu berlangsung lambat, air akan banyak keluar dari sel untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi air intraseluler dan ekstraseluler serta terjadi dehidrasi untuk menghindari pembekuan intraseluler. Apabila media pengencer didinginkan di bawah tingkat pendinginan maka kristal es menggumpal dan air akan mengalami pengkristalan keluar sebagai es (Watson, 2000).

Jika derajat penurunan suhu berlangsung cepat, keseimbangan potensial air akan terganggu dan air intraseluler akan membeku. Pada derajat penurunan suhu yang sangat cepat akan terbentuk kristal es yang halus di dalam sel yang mempunyai energi permukaan yang besar dan tidak stabil serta cenderung membentuk kristal es yang besar. Kondisi ini akan mengakibatkan kerusakan dan kematian sel (Park dan Graham, 1992).

Pengaruh yang ditimbulkan pada sel spermatozoa akibat pembentukan kristal es ialah penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa, peningkatan pengeluaran enzim intraseluler ke luar sel, dan kerusakan pada berbagai organel

seperti lisosom dan mitokondria. Lisosom yang pecah akan mengeluarkan asam hidrokortase sehingga akan mencerna bagian sel yang lain, sedangkan mitokondria yang rusak akan menyebabkan putusnya rantai oksidasi. Akibatnya, pergerakan spermatozoa terhenti karena tidak ada lagi pasokan energi dari organel mitokondria yang berfungsi merangsang fungsi mikrotubula. Hal tersebut akan mengakibatkan spermatozoa dapat bergerak secara bebas atau bersifat motil progresif (Gazali dan Surya, 2002).

### **II.6.3 Peroksidasi Lipid**

Spermatozoa dapat bergerak secara bebas karena adanya gerakan flagela. Flagela ini memiliki struktur kompleks dan motor penggerak utamanya ialah aksonema. Aksonema dibentuk oleh mikrotubula yang berasal dari sentriol pada inti spermatozoa. Pergerakan atau motilitas spermatozoa yang progresif disebabkan oleh pergesekan antar mikrotubula karena adanya oksigen yang berasal dari dynein. Oksigen akan diubah dari energi kimia menjadi energi mekanik. Oleh karena itu, ketersediaan oksigen dalam jumlah yang cukup sangat diperlukan oleh spermatozoa. Kelebihan oksigen akan menimbulkan kerusakan akibat peroksidasi lipid pada sel spermatozoa. Peroksidasi lipid terjadi karena adanya radikal bebas, yaitu senyawa kimia yang memiliki pasangan elektron yang tidak berpasangan. Radikal-radikal bebas tersebut antara lain superoksida ( $O_2^{\cdot}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) dan peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ). Radikal bebas bersifat sangat reaktif, dan bila bereaksi dengan asam lemak tak jenuh akan membentuk lipid peroksidasi (Siregar, 1992).

Timbulnya peroksidasi lipid selama proses pembekuan semen mempengaruhi kerusakan pada sel spermatozoa. Kerentanan spermatozoa

terhadap peroksidasi lipid disebabkan oleh fosfolipid membran plasma sel spermatozoa mamalia mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas dan merangsang terjadinya reaksi autokatalitik yang akan merusak ikatan gandanya (Watson, 2000).

Peroksidasi lipid berperan utama dalam proses penuaan dan memperpendek daya hidup spermatozoa dan mempengaruhi preservasi semen untuk inseminasi buatan. Hal tersebut akan menginduksi perubahan struktur terutama pada daerah akrosom, kehilangan motilitas secara cepat dan tidak dapat pulih kembali. Di samping itu terjadi perubahan metabolisme dan pelepasan komponen intraseluler dalam jumlah besar. Peroksidasi lipid yang berkepanjangan akan merusak struktur matriks lipid dan menyebabkan membrane sel tidak stabil. Bentuk dan ciri kerusakan sel spermatozoa akibat peroksidasi lipid ialah rendahnya motilitas dan kapasitas fertilisasi, kerusakan enzim intraseluler (seperti: aspartat transaminase = AST, alanina trasaminase = ALT, alkalin fosfatase = ALP, acid phosphatase= ACP, dan laktat dehidrogenase = LDH) dan kerusakan struktur membran plasma terutama pada bagian akrosom (White, 1993 dan Watson, 2000).

#### **II.6.4 Faktor Antibeku pada Plasma Semen**

Faktor antibeku yang terdapat dalam plasma semen mamalia ialah egg-yolk coagulating enzyme, trigliserol lipase, dan faktor antimotilitas. Egg-yolk coagulating enzyme (EYCE) merupakan salah satu enzim antibeku yang terdapat pada plasma semen kambing. EYCE diduga ialah enzim fosfolipase A yang disekresikan oleh kelenjar bulbouretralis (kelenjar cowper). Bila bereaksi dengan kuning telur yang terdapat dalam media pengencer akan mengakibatkan kematian

spermatozoa. Enzim fosfolipase-A menguraikan lesitin dari kuning telur menjadi lisolesitin dan asam lemak tak jenuh yang bersifat toksik (Evans dan Maxwell, 1987).

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **III.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, gelas objek, gelas ukur, gelas piala, microtube, hemositometer, pinset, micropipette, mikroskop, kamera, timbangan digital, Cryotube, *Bicell biofreezing vessel*, Cryocan, dan enkas.

#### **III.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel sperma Ikan beronang *Siganus guttatus*, extender yang digunakan yaitu glukosa dan larutan ringer yang terdiri atas 13,5 g / l NaCl, 0,60 g / l KCl, 0,25 g / l CaCl<sub>2</sub>, 0,35 g / l MgCl<sub>2</sub>, dan 0,2 g / l NaHCO<sub>3</sub>, kalsium (Ca-F saline) yang terkandung 21,63 g NaCl, 1,12 g KCl, 0,53 g H<sub>3</sub> BO<sub>3</sub>, 0,19 g NaOH dan 4.93 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub> Oin1L air suling steril (d disesuaikan dengan pH 7,4 dengan 1N HCl). DMSO 10%, *Trypan Blue* (TB) 1 %, dan nitrogen cair.

#### **III.3 Tahapan Penelitian**

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan tiga kali ulangan. Parameter yang diamati adalah viabilitas sel sperma. Suspensi sel sperma diencerkan menggunakan dua larutan ekstender yang berbeda dalam krioprotektan DMSO 10% sehingga terdapat empat perlakuan yaitu:

1. Larutan ekstender dan krioprotektan: Glukosa + DMSO
2. Larutan ekstender dan krioprotektan : Larutan ringer + DMSO

3. Krioprotektan tanpa ekstender : DMSO
4. Sel sperma tanpa Ekstender dan Krioprotektan

### **III.3.1 Pemeliharaan dan Pengambilan Sperma Ikan Baronang *Siganus guttatus***

Sampel Ikan baronang *Siganus guttatus* yang akan digunakan berasal dari Barru, Kabupaten Barru, Provinsi Sulawesi selatan. Sampel yang diambil adalah ikan jantan yang telah matang seksual sebanyak 4 ekor. Ikan baronang *Siganus guttatus* yang digunakan merupakan ikan hasil pembesaran di keramba jaring apung, berat berkisar antara 500 – 1000 gram. Pakan yang diberikan merupakan pakan buatan. Sperma ikan baronang dikeluarkan melalui teknik striping.

### **III.3.2 Isolasi Sel Sperma Ikan Baronang *Siganus guttatus***

Isolasi sel sperma dilakukan Proses stripping dengan cara mengurut secara perlahan pada daerah perut persis di depan papila alat kelamin sampai keluar cairan semen ikan yang berwarna putih dan kemudian ditampung dalam wadah cawan petri (Slembrouck *et al.*, 2005).

### **III.3.3 Kriopreservasi Semen Ikan Baronang *Siganus guttatus***

Suspensi sel sperma diencerkan menggunakan larutan ekstender. Sel sperma 100 µl ditambahkan ke dalam 800 µl larutan ekstender. Pada penelitian ini, digunakan dua larutan ekstender yang berbeda dalam krioprotektan DMSO 10% sebanyak 100 µl sehingga terdapat empat perlakuan yaitu:

1. Larutan ekstender dan krioprotektan: Glukosa + DMSO
2. Larutan ekstender dan krioprotektan :Larutan ringer + DMSO
3. Krioprotektan tanpa ekstender : DMSO

#### 4. Sel sperma tanpa Ekstender dan Krioprotektan

Suspensi sel sperma ditambahkan krioprotektan, selanjutnya sel sperma dipipet tetes lalu dihitung konsentrasi selnya terlebih dahulu. Suspensi sel sperma yang telah ditambahkan krioprotektan segera dimasukkan ke dalam cryotube. Cryotube dimasukkan ke dalam *biocell biofreezing vessel*. Sebelum dibekukan, sel gamet dalam wadah biocell tersebut disimpan terlebih dahulu pada lemari pendingin suhu 3-5°C selama 1-1,5 jam. Setelah mencapai suhu 3-5°C, biocell dipindah ke dalam freezer dengan suhu -20°C selama 1 jam, selanjutnya dilakukan proses pre-freezing dengan cara meletakkan 1-2 cm diatas permukaan N<sub>2</sub> cair selama 9 menit, diteruskan dengan proses freezing dengan menenggelamkan cryotube ke dalam N<sub>2</sub> cair. Pemeriksaan motilitas setelah thawing dilakukan setelah proses freezing dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x (Susilowati, 2010).

Cryotube yang berisi sel sperma disimpan dalam kontainer N<sub>2</sub> cair selama lebih dari satu minggu. Untuk menganalisis viabilitas sel sperma pasca kriopreservasi, dilakukan proses thawing. Thawing adalah proses pencairan kembali sel yang telah dibekukan. Thawing dilakukan dengan mencelupkan cryotube ke dalam air dengan temperature 30-32°C selama 10-15 menit. Sel sperma ikan baronang selanjutnya siap untuk segera diamati.

#### **III.3.4 Pengamatan Terhadap Jumlah dan Viabilitas Sel Sperma Sebelum dan Setelah Kriopreservasi**

Sebanyak 10 µl sel sperma digunakan untuk pengamatan mikroskopis yaitu untuk melihat viabilitas sel ikan baronang pasca thawing. Volume 10 µl sel dari sel sperma dicampurkan dengan 10 µl Trypan Blue (TB). Hasil campuran

tersebut diambil sebanyak 10 µl dan dimasukkan ke dalam hemositometer. Penghitungan dilakukan pada kamar hitung Neubauer menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10×40. Jumlah total sel dihitung dalam 5 kamar (masing-masing memiliki 25 ruangan kecil) secara diagonal (5 sudut).

Konsentrasi sel dihitung dengan rumus :

$$\frac{I+II+III+IV+V}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

Penghitungan sel yang hidup dan yang mati dilakukan dengan melihat warna sel. Sel yang hidup ditandai dengan warna putih atau transparan dan biru untuk sel yang mati. Pengamatan pada mikroskop dilakukan dengan perbesaran 100 x dan 400 x.

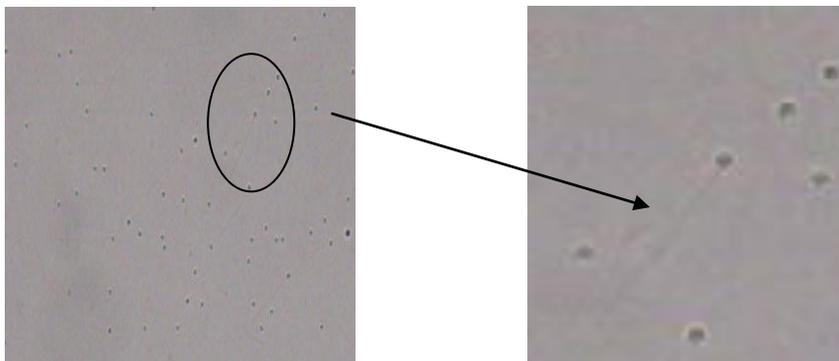
### **III. 4 Rancangan Percobaan dan Analisis Data**

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan tiga kali ulangan. Parameter yang diamati adalah viabilitas sel testikular dan kepadatan sperma. Data disajikan dalam bentuk persentase dan dianalisis dengan sidik ragam (Anova).

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### IV.1 Isolasi Sel Sperma Ikan Baronang *Siganus guttatus*

Sel sperma yang diisolasi dari badan ikan baronang *Siganus guttatus* berasal dari Barru, Kabupaten Barru, Provinsi Sulawesi selatan. Sampel yang diambil adalah ikan jantan yang telah matang seksual sebanyak empat ekor. Ikan baronang *Siganus guttatus* yang digunakan merupakan ikan hasil pembesaran di keramba jaring apung, beratnya berkisar antara 400 – 600 gram.

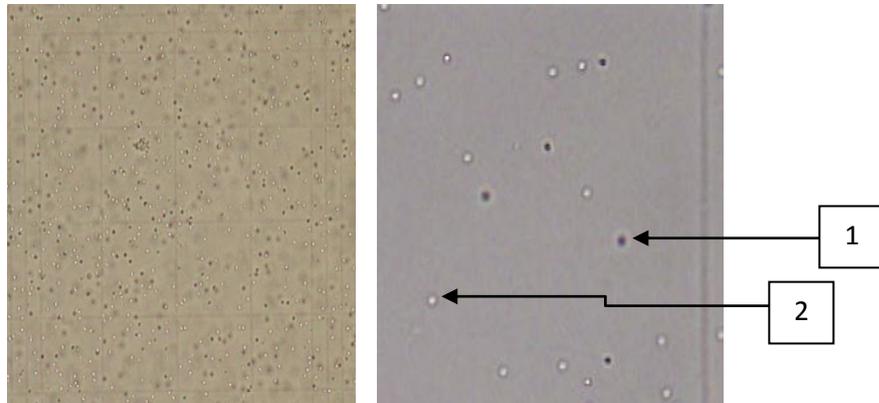


**Gambar 2. Sperma ikan baronang *Siganus guttatus* (Pembesaran 400x),  
Skala : 50  $\mu$ m**

Pada pengamatan Kepadatan sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* di bawah mikroskop menggunakan haemasitometer diperoleh nilai kepadatan  $1.745 \times 10^7$  sel/ml. Sel sperma yang diamati memiliki panjang ekor rata-rata 19  $\mu$ m dan diameter kepala rata-rata 0,44  $\mu$ m.

Sebanyak 4 ekor ikan baronang *Siganus guttatus* dengan berat berkisar antara 400 – 600 gram dikumpulkan dalam bak penampungan. Isolasi semen dari induk jantan dilakukan melalui metode stripping (pengurutan) secara manual dan dikumpulkan dalam tabung eppendorf. Semen pada ikan baronang *Siganus guttatus* bersifat cair dan berwarna putih. Selanjutnya semen dimasukkan

kedalam *bicell biofreezing vessel* untuk menjaga agar semen hasil stripping tidak mati.



Keterangan : 1.sel sperma yang mati, 2. Sel sperma yang hidup

**Gambar 3.** Sel sperma ikan Baronang *Siganus guttatus* hasil pengamatan sel hidup dan mati (Pembesaran 40x), Skala : 50  $\mu$ m

Hasil pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x dan bar 50  $\mu$ m dan pewarnaan triphan blue menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara sel sperma yang hidup dan sel sperma yang mati. Sel sperma yang hidup tidak terwarnai pada pewarnaan triphan blue sedangkan sel sperma yang mati terwarnai oleh pewarna triphan blue. Pengamatan dan perhitungan jumlah sel yang hidup dan mati dengan menggunakan haemocytometer. Dalam metode ini, triphan blue digunakan untuk membantu pengamatan dan perhitungan jumlah sel dalam penentuan viabilitas. Pada sel sperma ikan baronang yang mati akan kehilangan integrasi membrannya, sehingga triphan blue dapat masuk ke dalam dan mewarnai inti sel, sedangkan pada sel sperma yang hidup triphan blue tidak dapat masuk dan mewarnai inti sel karena adanya selektifitas membran sel. Pada sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* sel sperma yang mati akan tampak berwarna biru, bentuknya lebih besar dan bengkak, sedangkan pada sel sperma yang hidup, sel akan tampak bersinar dan bentuknya lebih kecil dibandingkan sel sperma yang mati (Gambar 3).

## **IV.2 Kriopreservasi Semen Ikan Baronang *Siganus guttatus***

Sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* hasil stripping kemudian siap untuk diberi perlakuan. Pada perlakuan pertama sel sperma dipipet sebanyak 100  $\mu$ l, krioprotektan DMSO 100  $\mu$ l dan extender ringer sebanyak 800  $\mu$ l, perlakuan ke dua sel sperma dipipet sebanyak 100  $\mu$ l, krioprotektan DMSO 100  $\mu$ l dan extender glukosa sebanyak 800  $\mu$ l, perlakuan ke tiga sel sperma dipipet sebanyak 100  $\mu$ l hanya ditambahkan krioprotektan sebanyak 100  $\mu$ l sedangkan pada perlakuan ke empat cryotube hanya diisi sel sperma sebanyak 100  $\mu$ l sebagai kontrol negatif. Pengamatan viabilitas sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* dilakukan untuk setiap perlakuan sebagai data awal untuk membandingkan dengan viabilitas pasca kriopreservasi. Hasil pengamatan viabilitas pada perlakuan pertama dengan menggunakan krioprotektan dan extender ringer yaitu 15,35 %, pada perlakuan kedua dengan menggunakan krioprotektan dan extender glukosa yaitu 15,45 %, perlakuan ketiga menggunakan krioprotektan tanpa extender yaitu 15,70 % dan sebagai kontrol negatif yaitu 15 %. Kepadatan sel sperma berdasarkan perhitungan menggunakan haemocytometer sebesar  $1.745 \times 10^7$  sel/ml. Sehingga menurut Yatim (1982), konsentrasi semen tersebut termasuk dalam golongan polyzoospermia karena jumlah spermanya lebih dari 250 juta/ml. Jumlah spermatozoa normal (normozoospermia) berada pada rentang antara 40 sampai 200 juta/ml.

## **IV.3 Viabilitas Sel Sperma Sebelum dan Setelah Kriopreservasi**

Pengamatan dilakukan pada sel sperma dengan 4 perlakuan yang berbeda, dimana sampel 1 di tambahkan dengan larutan extender ringer dan krioprotektan DMSO 10 %, sampel ke 2 ditambahkan larutan extender glukosa dan DMSO 10

% sedangkan larutan ke 3 sebagai kontrol hanya diberikan DMSO 10 % dan sampel ke 4 sebagai kontrol negatif hanya terdapat sel sperma tanpa extender dan krioprotektan. Hasil yang diperoleh dari 4 perlakuan tersebut setelah kriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil rata-rata pengujian I,II, III, dan IV menunjukkan bahwa glukosa merupakan larutan extender yang lebih efektif dari pada penggunaan ringer sebagai extender. Pada Tabel 3 memperlihatkan bahwa hasil rata-rata viabilitas sel yang menggunakan extender glukosa dan krioprotektan DMSO 10 % setelah kriopreservasi lebih tinggi dari pada 3 perlakuan lainnya yaitu 11,45 % pada ulangan I, 5,55 % pada ulangan II dan 4,3 % pada ulangan III, sementara itu rata-rata viabilitas sel yang menggunakan extender ringer yaitu 7,05 % pada ulangan I, 3,75 % pada ulangan II dan 3,25 pada ulangan ke III.

**Tabel 3.** Perbandingan jumlah viabilitas sel sperma sebelum dan setelah kriopreservasi

Perlakuan	Viabilitas sebelum kriopreservasi (%)				Viabilitas setelah kriopreservasi (%)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Ulangan								
1	15.53%	15.54%	15.70%	15.00%	7.05%	11.45%	0.90%	0.55%
2	15.53%	15.54%	15.70%	15.00%	3.75%	7.25%	0.50%	0.25%
3	15.53%	15.54%	15.70%	15.00%	3.25%	4.30%	0.90%	0.20%
Rerata	15.53%	15.54%	15.70%	15.00%	4.68%	7.10%	0.77%	0.33%

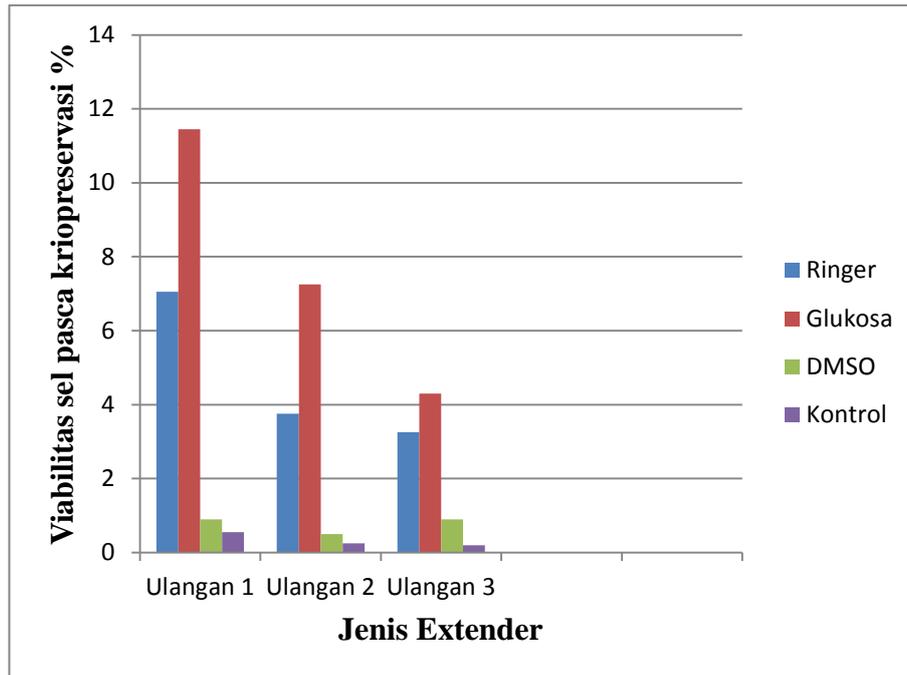
Keterangan :

I : Extender ringer dan Krioprotektan DMSO 10 %

I : Extender glukosa dan Krioprotektan DMSO 10 %

I : Krioprotektan DMSO 10 % tanpa Extender

IV : Sel Sperma tanpa Extender dan Krioprotektan DMSO 10 %



**Gambar 4.** Hasil pengamatan viabilitas sel sperma Ikan Baronang *Siganus guttatus*

Pada hasil pengamatan viabilitas sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* menunjukkan bahwa setiap perlakuan memiliki nilai rata-rata yang berbeda oleh karena itu digunakan uji Anova untuk mengetahui perbedaan rata-rata perlakuan dengan membandingkan varians. Berdasarkan hasil analisis varian dapat disimpulkan bahwa  $H_0$  (tidak terdapat pengaruh perlakuan terhadap viabilitas sel sperma) ditolak dan  $H_1$  (Pemberian extender berpengaruh terhadap viabilitas sel sperma) diterima yang menunjukkan bahwa jenis extender yang digunakan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap rata-rata viabilitas sel sperma pasca kriopreservasi. Nilai rata-rata viabilitas tertinggi dari extender yang digunakan adalah 11,45 yang dapat dicapai dengan menggunakan glukosa dapat dilihat pada Tabel 4. Oleh karena itu dilanjutkan dengan uji BNT taraf 5 %, terlihat pada Tabel 5 dibawah ini.

**Tabel 5.** Hasil Uji BNT terhadap viabilitas sel sperma pasca kriopreservasi

<b>Perlakuan</b>	<b>Rata-rata</b>	Nilai Pembanding BNT 5 % =3,95
Ringer	4,68*	
Glukosa	7,10*	
DMSO	0,77 <sup>tn</sup>	
Kontrol	0,33 <sup>tn</sup>	

Keterangan : tn = Tidak nyata

\* = Berbeda nyata

Berdasarkan Tabel di atas dari nilai rata-rata sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* terlihat bahwa viabilitas pada setiap perlakuan berbeda, namun setelah diuji dengan Anova dan dilanjutkan dengan uji BNT taraf 5% ternyata perbedaan untuk viabilitas pada perlakuan Kontrol (0,33<sup>tn</sup>), dan DMSO (0,77<sup>tn</sup>) sangat kecil sehingga secara statistik tidak menunjukkan adanya perbedaan atau tidak berbeda nyata, namun berbeda nyata pada Glukosa (7,10\*) dan Ringer (4,68\*).

Prinsip utama dalam proses kriopreservasi adalah terjadinya pengeluaran air (dehidrasi) sebelum terjadi pembekuan. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan yang menyebabkan sel akan mati. Prinsip perpindahan keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum freezing maupun dehidrasi pada saat pencairan kembali (thawing) menjadi perhatian khusus.

Penambahan krioprotektan dapat memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi sedangkan penambahan extender dibutuhkan untuk mengencerkan sperma dan umumnya dapat menginduksi motilitas dan meningkatkan fertilisasi sel yang dikriopreservasi. Penggunaan extender dan

krioprotektan yang cocok memiliki perbedaan untuk setiap spesies. Larutan ringer dan glukosa adalah larutan yang umum digunakan sebagai bahan extender karena kedua larutan ini mudah untuk didapatkan dan disiapkan.

Penggunaan krioprotektan DMSO 10 % tanpa larutan extender memperlihatkan banyak sel sperma yang mati pada saat kriopreservasi yang dikarenakan DMSO 10 % akan bersifat toksik bagi sel sperma, sedangkan sel sperma yang diuji menggunakan glukosa sebagai extender menunjukkan masih ditemukan sel sperma yang mampu bertahan hidup pasca kriopreservasi dibandingkan dengan menggunakan larutan ringer. Meskipun penggunaan glukosa dapat dikatakan lebih efektif dari dua larutan pengencer lainnya namun 3 sampel tersebut tetap saja menunjukkan terdapat sel yang mati atau hilang selama proses kriopreservasi.

Pada dasarnya, ada dua faktor utama selama proses kriopreservasi sel sperma yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bersamaan dengan pembentukan kristal es. Kejutan dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak dibawah suhu 0 °C. Pada kasus sel sperma, kejutan dingin menyebabkan terjadi penurunan motilitas, pelepasan enzim enzim pada akrosom, perpindahan ion melewati membran dan penurunan kandungan lipid (fosfolipid dan kolestrol) yang berperan untuk mempertahankan integritas struktural membran plasma (Weitzen dan Pedzoidt, 1992; White, 1993).

Pembentukan kristal-kristal es berkaitan erat dengan perubahan tekanan osmotik dalam fase tidak beku. Pada sel sperma dapat menyebabkan penurunan motilitas dan viabilitas sel sperma, peningkatan pengeluaran enzim-enzim

intraseluler ke ekstraseluler dan kerusakan pada organel-organel sel, seperti mitokondria dan lisosom (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Selama pembekuan dan pencairan kembali, sel sperma dapat mengalami kerusakan sebagai akibat dari eksposur bahan pada suhu rendah, formasi kristal es, dehidrasi sel dan formasi radikal bebas. Eksposur pada suhu rendah dapat mengakibatkan inaktivasi protein yang sensitif terhadap suhu dingin. Sebagian besar formasi es intraseluler bersifat letal dan pada dasarnya sel dapat mentolerir formasi es ekstraseluler. Namun demikian, formasi es ekstraseluler juga dapat merusak sel karena daya mekanis dari kristal-kristal es yang tumbuh, gaya adhesi kristal es terhadap membran, interaksi listrik yang disebabkan oleh perbedaan solubilitas ion pada fase es dan cair, formasi gelembung udara intraseluler, luka khemis yang berhubungan dengan peroksidase lipid dan perubahan pH pada lokasi tertentu (Rostika dan Ika, 2003).

Sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat menyebabkan terjadinya plasmolisis yang sama kuatnya sehingga mengakibatkan perubahan pH, interaksi mikromolekuler dan peningkatan pelelehan, tekanan osmotik dapat menyebabkan endositotik vesikulasi irreversibel yang mengakibatkan sel menjadi lisis karena bahan membran yang baru tidak mampu memfasilitasi deplasmolisis (Rostika dan Ika, 2003).

Kecocokan kombinasi antara larutan extender dan krioprotektan memiliki pengaruh yang besar terhadap kelangsungan hidup sel sperma selama kriopreservasi. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombinasi antara extender glukosa dengan krioprotektan DMSO dapat menghasilkan kualitas

sperma yang lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan larutan ringer sebagai extender.

Beberapa penelitian sebelumnya membuktikan bahwa penambahan sumber energi seperti glukosa dapat menghambat penurunan jumlah ATP intraselular selama penyimpanan (Zietara *et al.*, 2004). Glukosa juga dijadikan bahan extender karena efek stabilitasnya pada membran liposomal spermatozoa. Hatipoglu and Akcay (2010) menemukan bahwa glukosa sebagai extender merupakan bahan pengawet yang lebih baik dari pada extender ringer pada short-term preservation pada semen Abant trout *Salmo trutta abanticus*.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **V.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil pengamatan dan pengujian terhadap pengaruh beberapa jenis larutan ekstender terhadap viabilitas sel sperma ikan Baronang *Siganus guttatus* pasca kriopreservasi, maka dapat disimpulkan bahwa jenis larutan ekstender yang paling efektif dalam mempertahankan viabilitas sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus* pasca kriopreservasi adalah glukosa dengan nilai rata-rata tertinggi 11,45 %.

#### **V.2. Saran**

Sebaiknya dilakukan pengamatan viabilitas pada periode kriopreservasi yang lebih lama untuk mengetahui efektivitas krioprotektan terhadap kemampuan hidup sel sperma pasca kriopreservasi. Diharapkan agar penelitian ini dapat dilanjutkan dengan uji fertilitas pasca kriopreservasi sehingga potensi ikan baronang *Siganus guttatus* dapat diketahui dan dimanfaatkan dalam kehidupan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alvarenga, M. A., F.O. Papa, F.C. Landim-Alvarenga And A.S.L. Medeiros. 2005. **Amides As Cryoprotectants For Freezing Stallion Semen: A. Review Anim.** *Reprod. Sci.* 89: 105 – 113.
- Amann, R. P. 1999. **Cryopreservation Of Semen. Di Dalam: Encyclopedia Of Reproduction.** Vol. 1 London: Academic. hlm 773-783.
- Ayson FG, Reyes OS, Ayson EGTJ. 2014. **Seed production of rabbitfish *Signanus guttatus*.** *Aquaculture Extension Manual.* (59):1-9
- Barcelo-Fimbres, M. And G.E. Seidel Jr. 2007. **Effects Of Fetal Calf Serum, Phenazine Ethosulfate And Either Glucose Or Fructose During In Vitro Culture Of Bovine Embryos On Embryonic Development After Cryopreservation.** *Molecular Reprod. Develop.* 74:1395 – 1405.
- Bailey, J. L. and Buhr, M. M. 1994. **Cryopreservation Alters The Ca<sup>2+</sup> Flux Of Bovine Spermatozoa.** *Can J Anim Sci* 74:45-51.
- Boediono, A. 2003. **Vitrifikasi vs pembekuan lambat pada pembekuan embrio. Symposium Perkumpulan Teknologi Reproduksi Indonesia (PATRI).** Denpasar. hlm. 24 – 32.
- Bozkurt, Y., Yavaş, İ., Karaca, F. (2012). **Cryopreservation of brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) and ornamental koi carp (*Cyprinus carpio*) sperm.** *Current Frontiers in Cryopreservation*, Edited by: Katkov, I. Section IV, p.293-304, Celltronix and Sanford-Burnham Institute for Medical Research USA, ISBN: 978-953-51-0302-8, 462p.
- Chao, N.H. 1991. **Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extention efforts.** *International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture.* Taipei: Department of Aquaculture, Taiwan Fisheries Research Institute.
- Chen, S.U., Y.R. Lien, H.F. Chen, L.J. Chang, Y.Y. Tsai And Y.S. Yang. 2005. **Observational Clinical Follow-Up of Oocyte Cryopreservation Using A Slow-Freezing Method With 1,2-Propanediol Plus Sucrose Followed by ICSI.** *Human Reprod.* 20:1975 – 1980.
- Danchin Burge, C. and S.J. Hiemstra. 2003. **Cryopreservation of domestic animal species in France and Netherlands: Experience, similarities and differences.** *Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe* pp. 15 – 28.

- Diez, C., Y. Heyman, D. Le Bourhis, C. Guyader-Joly, J. Degrouard and J.P. Renard. 2001. **Delipidating In Vitro-Produced Bovine Zygotes: Effect On Further Development And Consequences For Freezability**. Theriogenology 55: 923 – 936.
- Evans, G. and Maxwell, WMC. 1987. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. London. Butterworth.
- Freshney, R. I. 2005. **Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique**. Ed ke -5. New York. J Wiley.
- Fishbase. 2001. **Pictorial Guide to Indonesian Reef Fishes [internet]**. [diunduh 2015 Mei 21]. Tersedia pada: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
- Gazali, M. dan Surya, N. T. 2002. **Kriopreservasi Sel Spermatozoa**. Hayati. Vol. 9(1):27-32.
- Gundermann N, Popper DM, LichatowichT. 1983. **Biology and life cycle of Siganus vermiculatus (Siganidae, Pisces)**. Pacific Science. 3(2)165-180.
- Hafez, E. S. E. 2000. **Preservation And Cryopreservation Of Gametes And Embryos. Di dalam: Hafez ESE, Hafez B (ed). Reproduction in Farm Animals**. Ed ke-7. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. hlm 431-442.
- Hatipoğlu T dan Akçay E. 2010. **Fertiliing ability of short term preserved spermatozoa Abant trout *Salmo trutta abanticus***. Ankara Univ Vet Fak Derg 57:33-38
- Kostaman, T. dan Setioko, A.R. 2011. **Perkembangan Penelitian Teknik Kriopreservasi Untuk Penyimpanan Semen Unggas**. Wartazoa. Vol.21(3):145-152.
- Kurokura, H., R. Hirano, M. Tomita and M. Iwahashi. 1984. **Cryopreservation of carp semen**. Aquaculture, 37: 267-273.
- Linhart, O., M. Rodinaand J. Cosson. 2000. **Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos**. Cryobiology 41: 241-250.
- Muchlisin, Z.A. 2005. **Review: Current Status Of Extenders And Cryoprotectants On Fish Spermatozoa Cryopreservation**. Biodiversitas. Vol. 6(1) : 66-69.

- Parks, J.E. And J.K. Graham. 1992. **Effects Of Cryopreservation Procedures On Sperm Membranes**. *Theriogenology* 38: 209 – 222.
- Rostika, Ika dan Ika Mariska. 2003. **Pemanfaatan Teknik Kriopreservasi dalam Penyimpanan Plasma Nutfah Tanaman**. *Buletin Plasma Nurfah* Vol. 9 No. 2
- Slembrouck, J., O. Komarudin, Maskur. dan M. Legendre. 2005. **Petunjuk Teknis Pembenihan Ikan Patin Indonesia, Pangasius djambal**. Terjemahan: Subandi, A dan Khan, Z. IRD dan Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Siregar, P. 1992. **Metabolit Oksigen Radikal Bebas Dan Kerusakan Jaringan**. *Cermin Dunia Kedokteran* 80:112-115.
- Stoss, J. and T. Refstie. 1983. **Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout**. *Aquaculture*, 30: 229-236.
- Susilowati, S. Hardijanto, T. W. Suprayogi, T. Sardjito, dan T. Hernawati. 2010. **Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan**. Airlangga University Press. Surabaya.
- Supriatna, I. dan Pasaribu, F. H. 1992. **In Vitro Fertilization, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio**. Bogor. PAU IPB
- Toelihere, M. R. 1985. **Inseminasi Buatan pada Ternak**. Bandung. Angkasa.
- Watson, P. F. 2000. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen**. *Anim Reprod Sci*60-61:481-492.
- Weitze, K. F. and Petzoldt, R. 1992. **Preservation Of Semen**. *Anim Reprod Sci* 28:229-235.
- White, I. G. 1993. **Lipids And Calcium Uptake Of Sperm In Relation To Cold Shock And Preservation**. A review. *Reprod Fertil Dev*5:639-658.
- Yatim, W. 1982. *Reproduksi dan Embriologi*. Tarsito, Bandung.
- Zietara, M.S, Slominska E., Rurangwa E., Ollevier F., Swierczynski J & Skorkowski E.F. 2004. **In Vitro Adenine Nucleotide Catabolism in African Catfish Spermatozoa Comp**. *Biochem. Physiol* 138B385389.

**Lampiran 1.** Data hasil perhitungan kepadatan dan viabilitas sel sperma sebelum dan setelah kriopreservasi dengan 3 perlakuan yang berbeda.

**Rumus perhitungan haemasitometer :**

$$\frac{I+II+III+IV+V}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

- Perhitungan kepadatan sebelum kriopreservasi (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{79+85+65+59+61}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$= 1,745 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$= 1,745 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$= 17.450.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 1 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{69+81+60+42+55}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$= 1,535 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$= 15.535.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 2 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{65+84+50+60+50}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$= 1,545 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$= 15.545.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 3 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{59+74+80+49+52}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$= 1,570 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$= 15.700.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 4 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{73+85+45+42+55}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=1,500 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=1.500.000.000 \text{ sel/ml}$$

#### ❖ **Perhitungan viabilitas pada ulangan I**

- Perhitungan viabilitas perlakuan 1 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{28+37+26+24+26}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=705 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=7.050.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 2 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{56+41+35+42+55}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=1,145 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=11.450.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 3 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{1+4+5+4+4}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=90 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=900.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 4 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{0+3+4+4+0}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=55 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=550.000.000 \text{ sel/ml}$$

#### ❖ **Perhitungan viabilitas pada ulangan II**

- Perhitungan viabilitas perlakuan 1 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{13+12+9+8+33}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=375 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=3.750.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 2 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{30+27+26+33+29}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=725 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=7.250.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 3 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{1+4+0+2+3}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=50 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=500.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 4 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{1+3+0+0+1}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=25 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=250.000.000 \text{ sel/ml}$$

### ❖ Perhitungan viabilitas pada ulangan III

- Perhitungan viabilitas perlakuan 1 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{10+14+12+10+19}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=325 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=3.250.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 2 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{15+18+21+13+19}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ ml}$$

$$=430 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$=4.300.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 3 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{9+0+6+0+3}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

$$= 90 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$= 900.000.000 \text{ sel/ml}$$

- Perhitungan viabilitas perlakuan 4 (3 kali Pengenceran)

$$= \frac{0+3+1+0+0}{5} \times 25 \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

$$= 20 \times 10^7 \text{ sel/ml}$$

$$= 200.000.000 \text{ sel/ml}$$

**Lampiran 2.** Data hasil perhitungan Analisis varian (ANOVA)

- **Jumlah Kuadrat Total (JKT)**

$$JKT = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - \frac{T_{**}^2}{N}$$

$$JKT = (7,05^2 + 3,75^2 + 3,25^2 + 4,68^2 + 11,45^2 + 7,25^2 + 4,30^2 + 7,10^2 + 0,90^2 + 0,50^2 + 0,90^2 + 0,$$

$$77^2 + 0,55^2 + 0,25^2 + 0,20^2 + 0,33^2) - (53,23^2/12)$$

$$= 351,74 - 4,43$$

$$= 347,31$$

- **Jumlah Kuadrat Kolom (JKK)**

$$JKK = \sum_{i=1}^k \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T_{**}^2}{N}$$

$$JKK = (18,7^2/4 + 30,1^2/4 + 3,07^2/4 + 1,33^2/4) - (53,23^2/12)$$

$$= (87,42 + 226,50 + 2,35 + 0,44) - 4,43$$

$$=317- 4,43$$

$$=312,57$$

- **Jumlah Kuadrat Galat (JKG)**

$$JKG = JKT - JKK$$

$$= 347,31-312,57 = 34,74$$

- **Kuadrat Tengah Kolom (KTK)**

$$KTK = JKK / k-1$$

$$= 312,57/4-1$$

$$= 104,19$$

- **Kuadrat Tengah Galat (KTG)**

$$KTG = JKG / N - k$$

$$= 34,74/12 -4$$

$$= 4,34$$

- **f hitung**

$$f \text{ hitung} = KTK / KTG = 104,19/4,34 = 23,99$$

**Tabel 4.** Hasil analisis varian viabilitas sel sperma ikan baronang *Siganus guttatus*

Sumber Keragaman (SK)	Jumlah Kuadrat (JK)	Derajat Bebas (db)	Kuadrat Tengah (KT)	F hitung
Kolom (K)	312,57	3	104,19	23,99
Galat (G)	34,74	8	4,34	
Total (T)	347,31	11		F tabel 4,07

□ Menghitung  $F_{\text{tabel}}$

F table pada  $\alpha = 0.05$  db1=3 dan dk2= 8 adalah 4,07

**Lampiran 3**

**Tabel 5.** Hasil Uji BNT terhadap viabilitas sel sperma pasca kriopreservasi

Perlakuan	Rata-rata	Nilai Pembanding BNT 5 %  =3,95
Ringer	4,68*	
Glukosa	7,10*	
DMSO	0,77 <sup>tn</sup>	
Kontrol	0,33 <sup>tn</sup>	

Keterangan : tn = Tidak nyata

\* = Berbeda nyata

**Lampiran 4**

Foto tahapan – tahapan Penelitian



Bak pemeliharaan ikan Baronang  
*Siganus guttatus*



Sampel ikan Baronang *Siganus guttatus* yang akan di stripping



Proses stripping ikan Baronang  
*Siganus guttatus*



Stok sperma ikan Baronang  
*Siganus guttatus*



Perlakuan terhadap semen ikan  
Baronang *Siganus guttatus*



Sel sperma dalam cryotube  
dengan 4 perlakuan



Sel sperma dalam freezer  $-20^{\circ}\text{C}$



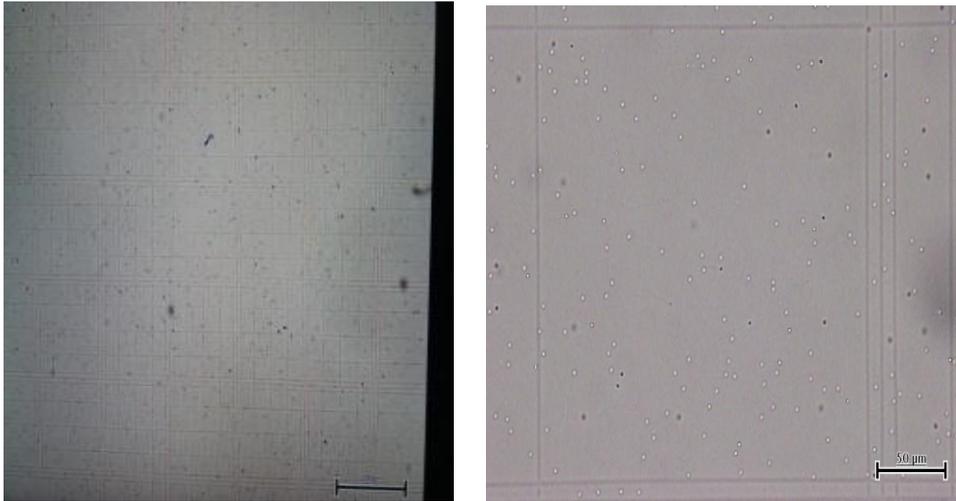
Sel sperma dalam freezer  $-80^{\circ}\text{C}$



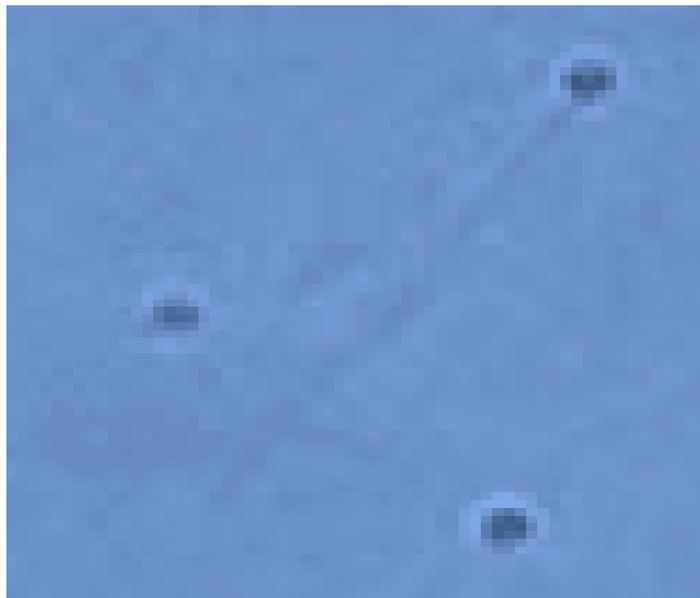
Sel sperma pasca thawing



Sel sperma yang telah ditambahkan Triphan Blue



Hasil pengamatan sel sperma dibawah mikroskop dengan perbesaran 10 x40 dan skala Skala : 50 µm



Hasil pengamatan sel sperma dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dan skala Skala : 50 µm