

Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842)

Ade Sunarma¹, Dewi Wisudiyanti Budihastuti² dan Yulia Sistina³

¹ Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT), Sukabumi. Telp: 08164638479. E-mail: sunarma@yahoo.com

² Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

³Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Diterima 11 Maret 2010; disetujui 5 Mei 2010

ABSTRACT

Sperm cryopreservation is beneficial for aquaculture industry (e.g. maintaining genetic variability of broodstock, efficient utilizing of sperm and synchronizing of artificial reproduction) and for ex-situ conservation (gene banks of endangered species, indigenous organism and valuable strain). Nilem is an representative model for investigating basic cryobiological parameters and developing a cryopreservation procedure for commercially cultured fish and endangered species in the cyprinid. The experiment was conducted to investigate effective combination of honey as an extender with dimethyl sulfoxide (DMSO) or methanol as cryoprotectants. Milt was diluted in extender (honey 0,5%) at the ratio of 1:9 then cryoprotectant was added at 5%, 10% or 15% (v/v) concentrations. Samples were stored in 0,5 mL straws, equilibrated at temperature 4-5 °C for 20 minutes, vaporized at 3 cm above surface liquid nitrogen for 7 minutes and then plunged into liquid nitrogen, where they were stored for 2 weeks. Sperm was thawed at temperature 39-40 °C for 10-15 seconds and was used to fertilize 100-200 eggs per straw. The percentage of sperm motility of pre-frozen sperm was not significantly different in all treatment and the highest post-thawed sperm motility was the combination of honey extender and DMSO 15% (63,33%). Sperm cryopreservation using honey with DMSO 15% resulted in highest hatching rate (87,97%). The utilization of honey in combination with DMSO proved to be suitable for cryopreservation of Nilem sperm, especially with regard to sperm motility and success of hatching from fertilized egg by frozen-thawed sperm.

Keyword: cryopreservation, sperm, sperm motility, hatching rate, fish

PENDAHULUAN

Ikan Nilem (*Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842) merupakan salah satu jenis ikan asli perairan Indonesia. Meskipun tidak sepopuler ikan mas, namun di beberapa sentra budidaya, ikan ini lebih diminati baik oleh para pembudidaya ikan maupun oleh para konsumen, misalnya daerah Tasikmalaya, Ciamis, Banyumas, Purbalingga dan Banjarnegara. Berbeda dengan ikan mas yang kebanyakan hanya diminati pada ukuran konsumsi (250–500 gram/ekor), ikan Nilem banyak dikonsumsi mulai dari telur, ukuran menjeri hingga ukuran konsumsi (100–150 gram/ekor).

Ikan Nilem ini termasuk famili Cyprinidae dengan keragaman spesies endemik di Indonesia yang cukup tinggi (dari 33 spesies yang teridentifikasi, 13 spesies diantaranya merupakan spesies endemik, 12 spesies terdapat di perairan Indonesia dan Asia (Froese and Pauly, 2007)). Mengingat keragaman yang cukup tinggi,

konservasi terhadap ikan ini layak untuk dilakukan sebagai upaya menyelamatkan plasma nutfah Indonesia. Upaya konservasi dengan tetap mendukung upaya produksi dapat tetap dilakukan salah satunya dengan penelitian pada bidang reproduksi, diantaranya melalui kriopreservasi sperma. Kriopreservasi sperma dapat memberikan keuntungan terhadap industri akuakultur, contohnya mempertahankan keragaman genetik induk, memanfaatkan sperma secara efisien dan sinkronisasi reproduksi secara buatan dan konservasi *ex-situ* (bank gen spesies terancam punah, organisme indigenous dan strain yang bernilai tinggi).

Ukuran ikan dewasa yang relatif kecil, menjadikan ikan Nilem sebagai model yang dapat mewakili untuk menginvestigasi parameter kryobiologi dasar dan mengembangkan prosedur kriopreservasi sperma/embrio ikan. Kriopreservasi pada famili Cyprinidae diperlukan untuk mempertahankan stok ikan budidaya yang lebih

komersial namun terancam penyakit, misalnya ikan mas, *Cyprinus carpio*, atau sebagai konservasi *ex-situ* ikan yang terancam punah, seperti ikan dewa, *Tor soro*.

Penelitian mengenai kriopreservasi, khususnya sperma, sudah dimulai sekitar 50-an tahun lalu dan sudah dilakukan pada lebih dari 230 spesies organisme akuatik (Dong *et al.*, 2007). Teknologi kriopreservasi telah dikembangkan secara ekstensif untuk tujuan memperpanjang kemampuan hidup gamet dengan teknik penyimpanan pada temperatur rendah sehingga dapat mengurangi aktifitas metabolik gamet tersebut. Pada temperatur -196°C , gamet dapat bertahan untuk waktu yang tidak terbatas meskipun akibat pengaruh radiasi sebelumnya dapat menyebabkan akumulasi kerusakan DNA yang tidak bisa diperbaiki oleh enzim sehingga batas waktu hidup gamet akan mencapai ribuan tahun (Tiersch, 2006). Keberhasilan pengawetan sperma ditentukan oleh bahan pengencer (*extender*), bahan pengawet (*cryoprotectant*), rasio pengenceran (*dilution ratio*), laju pembekuan dan pencairan kembali (*freezing dan thawing rate*) dan larutan pengencer pada pembuahan (Billard *et al.*, 1995). Pada penelitian ini, telah dikaji mengenai efektifitas penggunaan ekstender madu yang dikombinasikan dengan krioprotektan dimethyl sulfoxide (DMSO) atau methanol.

METODA

Pengambilan Sperma dan Fertilisasi

Induk jantan dan betina nilam yang sudah matang gonad dipilih sebanyak 2 pasang. Untuk merangsang produksi sperma yang lebih banyak dan kematangan akhir telur, setiap induk diberi rangsangan dengan injeksi secara intra-muskular menggunakan kombinasi GnRH α dengan domperidone (Ovaprim, Syndel) dosis 0,5 ml/kg. Induk jantan dan betina yang telah disuntik disimpan dalam wadah terpisah pada temperatur inkubasi $25-26^{\circ}\text{C}$ dan diberi aerasi.

Pengambilan sperma dilakukan 8–10 jam setelah injeksi, dengan cara melakukan pengurutan pada bagian perut. Sperma yang mengindikasikan tercampur dengan cairan urine atau kotoran lainnya dipisahkan dan tidak digunakan. Sperma yang berasal dari dua induk dikumpulkan dalam satu wadah dan diamati kualitasnya untuk digunakan pada perlakuan penelitian. Pengeluaran telur dilakukan 8–10 jam setelah injeksi dengan cara yang sama pada induk jantan. Telur disimpan pada wadah yang kering untuk digunakan pada fertilisasi.

Fertilisasi dilakukan dengan cara mencampur telur (100–200 butir) dengan 0,5 mL sperma segar, sperma pra-pembekuan dan sperma pasca-thawing. Sperma segar diencerkan 10x dalam larutan ekstender madu sedangkan sperma pra-pembekuan dan sperma pasca-thawing sesuai dengan perlakuan. Sperma pra-pembekuan baru digunakan untuk fertilisasi sekitar 40 menit setelah pencampuran sperma dengan ekstender dan krioprotektan. Keterlambatan fertilisasi ini dapat terjadi akibat adanya waktu equilibrasi (20 menit) dan waktu penanganan sperma untuk proses vaporasi dan penyimpanan straw ke dalam kontainer nitrogen cair (sekitar 20 menit). Sperma pasca-thawing dapat digunakan sesaat setelah selesai proses pencairan. Telur hasil fertilisasi diletakkan pada wadah plastik (volume air sekitar 200 mL) dan diberi aerasi. Inkubasi telur dilakukan pada temperatur $26-27^{\circ}\text{C}$.

Kriopreservasi Sperma

Sperma segar yang dikumpulkan dari dua induk jantan yang menunjukkan motilitas $> 80\%$ digunakan pada perlakuan. Sebanyak 2 mL sperma diambil dari setiap induk ikan sehingga didapatkan 4 mL sperma gabungan. Pengenceran sperma dilakukan dengan menggunakan perbandingan sperma: ekstender yaitu 1 : 9. Sebanyak 2 mL sperma ditambahkan ke dalam 18 mL larutan ekstender madu (0,5 % madu dalam larutan Ringer). Krioprotektan (DMSO atau methanol) ditambahkan dengan konsentrasi setiap bahan, yaitu: 5%, 10% dan 15 % pada konsentrasi akhir. Semua proses penyiapan dilakukan pada temperatur $4-5^{\circ}\text{C}$.

Setelah proses penyiapan kriopreservasi dilakukan, sperma dimasukkan ke dalam straw (IMV Technology) ukuran 0,5 mL dan ditutup dengan menggunakan kristal polyvinyl alkohol. Kemudian sperma disimpan pada temperatur $4-5^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit untuk proses equilibrasi. Setelah proses equilibrasi, straw disusun di atas rak vaporasi yang terbuat dari bahan styrofoam. Vaporasi dilakukan dengan meletakkan rak vaporasi 3 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 7 menit di dalam wadah styrofoam. Setelah vaporasi, proses freezing dilakukan dengan cara straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Penyimpanan dalam kontainer nitrogen cair (XT34, Taylor-Wharton) dilakukan selama 2 minggu. Pencairan kembali (*thawing*) dilakukan dengan mencelupkan straw ke dalam air pada temperatur $39-40^{\circ}\text{C}$ selama 10–15 detik.

Pengamatan Motilitas Spermatozoa dan Daya Tetas Telur

Pengamatan terhadap motilitas sperma dilakukan pada sperma segar, sperma pra-pembekuan (setelah equilibrasi) dan pasca-thawing. Aktifasi sperma dilakukan dengan menambahkan larutan aktifator (45 mM NaCl, 5 mM KCl dan 30 mM TRIS dalam 100 mL aquades) dengan perbandingan 1 : 50 (1 μ L sperma dengan 49 μ L aktifator). Larutan aktifator yang digunakan telah disimpan pada temperatur 4–5 °C. Pengamatan motilitas dilakukan dengan meletakkan sampel sperma pada gelas obyek dibawah mikroskop (ML2300, Meiji) lensa obyek 10X yang disambung dengan kamera (CK3900, Meiji) dan TV monitor (Trinitron, Sony). Persentase motilitas ditentukan berdasarkan pergerakan sperma setelah diaktifasi.

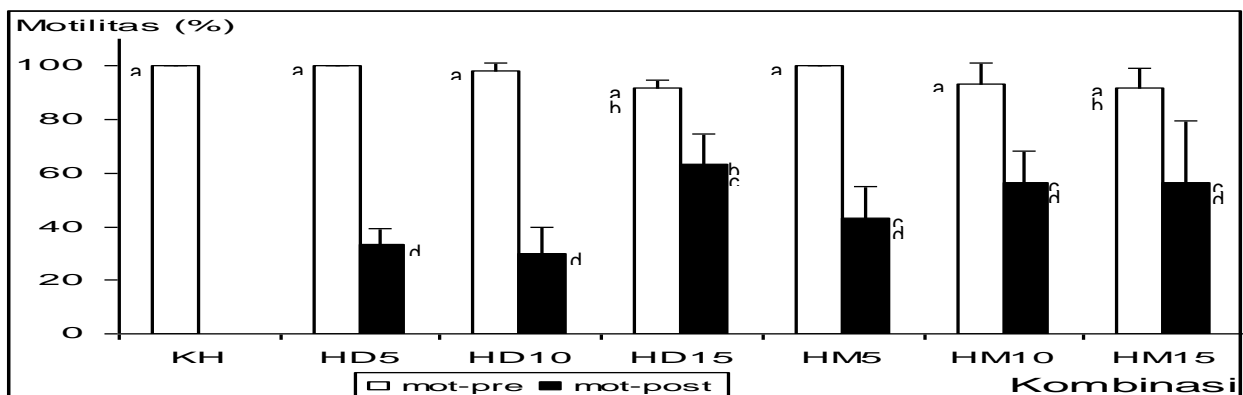
Pengamatan daya tetas dilakukan setelah telur hasil fertilisasi menetas (sekitar 24 jam setelah fertilisasi). Persentase daya tetas ditentukan berdasarkan rasio jumlah larva yang dihasilkan dengan jumlah telur yang ditetaskan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

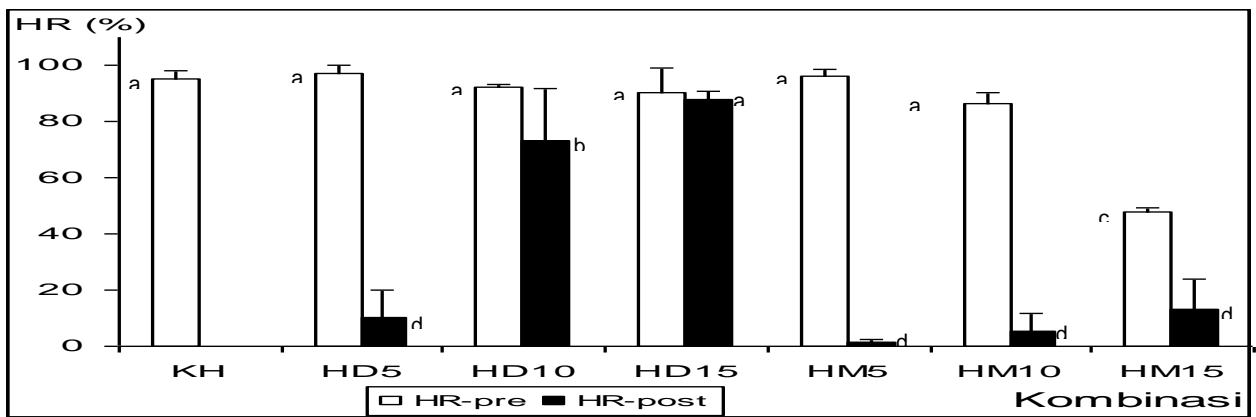
Motilitas spermatozoa pra-pembekuan antara kontrol dan semua perlakuan tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dan berada pada rentang 91,67%–100% sedangkan pada spermatozoa pasca-thawing menunjukkan perbedaan antar perlakuan (Gambar 1). Motilitas spermatozoa pasca-thawing tertinggi dicapai pada perlakuan kombinasi ekstender madu dengan DMSO 15% (63,33%) sedangkan terendah dicapai pada perlakuan kombinasi ekstender madu dengan DMSO 10%

(30,00%). Peningkatan konsentrasi krioprotektant, baik DMSO maupun methanol tidak berpengaruh terhadap persentase motilitas sperma pra-pembekuan namun memberikan pengaruh yang nyata pada motilitas sperma pasca-thawing.

Tingkat penetasan telur yang dibuahi spermatozoa pra-pembekuan antara kontrol dan perlakuan tidak berbeda nyata ($P>0,05$) kecuali pada perlakuan kombinasi ekstender madu dengan methanol 15% (HM15) sedangkan pada spermatozoa pasca-thawing menunjukkan perbedaan antara perlakuan ($P>0,05$) (Gambar 2). Penetasan telur pada HM15 lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain, hal ini diduga akibat adanya pengaruh racun methanol lebih tinggi dibandingkan konsentrasi spermatozoa, sehingga menurunkan kemampuan spermatozoa untuk membuahi telur. Meskipun waktu equilibrasi hanya 20 menit, namun penggunaan sperma untuk fertilisasi baru dapat dilakukan sekitar 40 menit setelah penambahan krioprotektant pada campuran sperma (lihat Bahan dan Metode). Tingkat penetasan telur tertinggi dicapai pada perlakuan kombinasi ekstender madu dengan DMSO 15% (87,97%) dan tidak berbeda baik dengan kontrol segar maupun dengan spermatozoa pra-pembekuan pada kombinasi yang sama, sedangkan terendah dicapai pada perlakuan kombinasi ekstender madu dengan methanol 5% (1,34%). Peningkatan konsentrasi DMSO berpengaruh terhadap peningkatan penetasan telur yang dibuahi spermatozoa pasca-thawing sedangkan peningkatan konsentrasi methanol tidak berpengaruh meskipun terdapat kecenderungan peningkatan penetasan telur.



Gambar 1. Motilitas Spermatozoa Ikan Nilem Pra-Pembekuan (mot-pre) dan Pasca-Thawing (mot-post) pada Kombinasi Ekstender Madu dengan Krioprotektant Berbeda. KH: Kontrol Ekstender Madu; HD: Kombinasi Ekstender Madu dengan DMSO; HM: Kombinasi Ekstender Madu dengan Methanol; 5, 10 dan 15: Konsentrasi Krioprotektan yang Digunakan (dalam %). Huruf yang Berbeda Menunjukkan Perbedaan yang Signifikan ($P<0,05$).



Gambar 2. Tingkat Penetasan Telur yang Dibuahi Spermatozoa Ikan Nilem Pra-Pembekuan (HR-pre) dan Pasca-Thawing (HR-post) pada Kombinasi Ekstender Madu dengan Krioprotektant Berbeda. KH: Kontrol Ekstender Madu; HD: Kombinasi Ekstender Madu dengan DMSO; HM: Kombinasi Ekstender Madu dengan Methanol; 5, 10 dan 15: Konsentrasi Krioprotektan yang Digunakan (dalam %). Huruf yang Berbeda Menunjukkan Perbedaan yang Signifikan ($P < 0,05$).

Kombinasi ekstender madu dengan krioprotektant DMSO atau methanol dimungkinkan dapat memberikan perlindungan yang baik terhadap adanya kerusakan spermatozoa selama proses pembekuan (krioinjuri) baik sebagai “non-permeating cryoprotectant” (madu) maupun sebagai “permeating cryoprotectant” (DMSO atau methanol). Krioinjuri selama proses kriopreservasi kebanyakan terjadi pada saat temperatur berada pada kisaran 0–40 °C terutama akibat adanya pelepasan panas, fluktuasi pH, kejutan dingin, pembentukan kristal es, pengaruh osmometrik, perubahan komposisi dan struktur membran sel, perubahan ukuran volume sel dan toksisitas krioprotektan (Rana, 1995; Chao and Liao, 2001). Ekstender madu yang digunakan juga dapat berfungsi untuk mempertahankan kemampuan sperma dalam membuahi telur setelah mengalami proses kriopreservasi. Pada proses kriopreservasi, ekstender bukan hanya sebagai pengencer sperma tetapi juga harus mampu berfungsi sebagai pengontrol kondisi pH dan penyedia sumber nutrisi bagi spermatozoa sehingga fungsionalitas dan kapabilitas sperma dapat dipertahankan (Tiersch, 2006). Pada penelitian ini, ekstender madu (0,5 % madu dalam larutan Ringer) merupakan bahan pengencer sperma dengan kombinasi bahan dasar gula dan ion-ion garam. Ekstender dengan bahan dasar gula yang banyak digunakan pada kriopreservasi sperma ikan, diantaranya: glukosa atau sukrosa 30–600 mM (Kusuda, 2004) atau 4–5 % (Viveiros *et al.*, 2000) dan kombinasi glukosa, sukrosa, fruktosa

atau laktosa dalam larutan ion-ion garam pada kisaran 0,6–10 g/L (Rana, 1995).

Pada penelitian ini, kombinasi ekstender madu dengan DMSO memberikan perlindungan yang lebih baik dibandingkan dengan kombinasi ekstender madu dengan methanol. Menurut Rurangwa *et al.* (2001), DMSO sebagai krioprotektant memiliki kemampuan yang cepat untuk penetrasi ke dalam sel pada saat equilibrasi dan meninggalkan sel pada saat thawing sehingga banyak digunakan pada proses kriopreservasi. Meskipun hasil ini berbeda dengan penelitian Horvath *et al.* (2003) yang menunjukkan kombinasi ekstender bahan gula dengan methanol menghasilkan tingkat motilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan DMSO. Rendahnya tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma pasca-thawing pada kombinasi ekstender madu dengan methanol diduga akibat waktu equilibrasi yang digunakan terlalu lama (20 menit). Prosedur kriopreservasi dengan menggunakan methanol 10% sebagai krioprotektant tidak dilakukan equilibrasi (Horvath *et al.*, 2007) meskipun tidak terdapat perbedaan penurunan motilitas spermatozoa pasca-thawing antara perlakuan equilibrasi selama satu jam, 48 jam dan 5 hari dengan krioprotektan 5% methanol (Christensen and Tiersch, 2005).

Peningkatan konsentrasi DMSO (hingga 15%) memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap spermatozoa, yang ditunjukkan dengan motilitas dan tingkat penetasan telur tertinggi yang dicapai pada penelitian ini. Kombinasi ekstender

glukosa dengan DMSO 15% dapat menghasilkan tingkat fertilisasi 48,41% (Tekin et al., 2007), sedangkan penelitian pada tingkat ultrastruktur menunjukkan DMSO pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap membran-plasma spermatozoa pasca-thawing (He and Wood, 2004).

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian ini menunjukkan kombinasi ekstender madu dengan DMSO 15% menghasilkan motilitas spermatozoa dan tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma pasca-thawing tertinggi masing-masing 63,33% dan 87,97%. Hasil tersebut tidak berbeda baik dengan kontrol segar maupun dengan spermatozoa pra-pembekuan sehingga kombinasi ini terbukti layak untuk digunakan pada kriopreservasi sperma ikan nilam dan dapat digunakan untuk optimasi prosedur kriopreservasi lainnya. Penelitian selanjutnya diperlukan untuk mengetahui kemampuan perlindungan kombinasi tersebut pada penerapan prosedur kriopreservasi sperma ikan-ikan *Cyprinidae* lainnya.

Daftar Pustaka

- Billard R, J. Cosso, L. W. Crim and M. Suquet. 1995. Sperm Physiology and Quality. Hal. 25-52. Dalam N. L. Bromage, R. J. Roberts (eds.). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science. London.
- Chao N.H and I. C. Liao. 2001. Cryopreservation of Finfish and Shellfish Gametes and Embryos. *Aquaculture*, 197:161–189.
- Christensen J. M and T. R. Tiersch. 2005. Cryopreservation of Channel Catfish Sperm: Effects of Cryoprotectant Exposure Time, Cooling Rate, Thawing Conditions, and Male-to-male Variation. *Theriogenology*, 63:2103–2112.
- Dong Q, C. Huang and T .R. Tiersch. 2007. Control of Sperm Concentration is Necessary for Standardization of Sperm Cryopreservation in Aquatic Species: Evidence from Sperm Agglutination in Oysters. *Cryobiology*, 54:87–98.
- Froese R and D. Pauly (Editors). 2007. FishBase. World Wide Web Electronic Publication. www.fishbase.org. Version (02/2007). Diakses tanggal 07 Mei 2007.
- He S and L.C. Woods III. 2004. Effects of Dimethyl Sulfoxide and Glycine on Cryopreservation Induced Damage of Plasma Membranes and Mitochondria to Striped Bass (*Morone saxatilis*) Sperm. *Cryobiology*, 48:254–262.
- Horvath A, E. Miskolczi and B. Urbanyi. 2003. Cryopreservation of Common Carp Sperm. *Aquatic Living Resources*, 16:457–460.
- Horvath A, E. Miskolczi, S. Mihalfy, K. Osz, K. Szabo and B. Urbanyi. 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1,2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54(3):251–257.
- Kusuda S. 2004. Current Status and Perspective of Cryopreservation of Sperm and Blastomeres in Fish. *Suisanzoshoku*, 34:1–25.
- Rana K. 1995. Preservation of Gametes. Dalam N. L. Bromage, R. R. Roberts (eds.). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science. London. Hal. 53–75.
- Rurangwa E, F. A. M. Volckaert, G. Huyskens, D. E. Kime and F. Ollevier. 2001. Quality Control of Refrigerated and Cryopreserved Semen using Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA), Viable Staining and Standardized Fertilization in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 55:751–769.
- Tekin N, S. Secer, E. Akcay, Y. Bozkurt and S. Kayam. 2007. Effects of Glycerol Additions on Post-Thaw Fertility of Frozen Rainbow Trout Sperm, with an Emphasis on Interaction between Extender and Cryoprotectant. *Journal of Applied Ichthyology*, 23:60–63.
- Tiersch T. R. 2006. Fish Sperm Cryopreservation for Genetic Improvement and Conservation in Southeast Asia. *Fish for the People*, 4(2):21–33.
- Viveiros A. T. M, N. So and J. Komen. 2000. Sperm Cryopreservation of African Catfish *Clarias gariepinus*: Cryoprotectants, Freezing Rates and Sperm:Egg Dilution Ratio. *Theriogenology*, 54:1395–1408.