

Pengaruh Pemberian Kuning Telur Terhadap Viabilitas Sperma Ikan Lukas (*Puntius bramoides* Val) Pascakriopreservasi

Primasari Pertiwi^{1*}, Abinawanto²

¹Fakultas MIPA, Program Studi Biologi, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia

²Fakultas MIPA, Program Studi Biologi, Universitas Indonesia, Depok,

Email: [1*primasari.pertiwi@fmipa.ac.id](mailto:primasari.pertiwi@fmipa.ac.id), [2abinawanto@gmail.com](mailto:abinawanto@gmail.com)

(* : coressponding author)

Abstrak – Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi kuning telur sebagai krioprotektan alami yang efektif untuk kriopreservasi serta menganalisis kualitas spermatozoa ikan lukas (*Puntius bramoides* Val) 48 jam pascakriopreservasi. Penelitian ini menggunakan 9 perlakuan dan 4 kali ulangan. Konsentrasi kuning telur yang digunakan sebagai krioprotektan adalah 0% (kontrol negatif), 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 17%, dan penggunaan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1% sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan beberapa konsentrasi kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler alami mampu mempengaruhi nyata ($P < 0,005$) terhadap kualitas spermatozoa ikan lukas 48 jam pascakriopreservasi. Penggunaan kuning telur konsentrasi 9% merupakan konsentrasi optimum dalam menjaga viabilitas spermatozoa ikan lukas dengan rata-rata persentase yang diperoleh masing-masing sebesar $80,75 \pm 1,55\%$.

Kata Kunci: Ikan Lukas, Viabilitas, Kriopreservasi, Kuning Telur.

Abstract – The research aims to determine the effect of several concentrations of egg yolk as an effective natural cryoprotectant for cryopreservation and to analyze the quality of lukas fish spermatozoa (*Puntius bramoides* Val) 48 hours after cryopreservation. This research used a 9 treatments and 4 replications. The concentration of egg yolk used as a cryoprotectant was 0% (negative control), 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 17%, and 1% *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) was used as a positive control. The results showed that the use of several concentrations of egg yolk as a natural extracellular cryoprotectant was able to significantly influence ($P < 0.005$) the quality of Lukas fish spermatozoa 48 hours after cryopreservation. The use of egg yolk concentration of 9% is the optimum concentration in maintaining the viability of Lukas fish spermatozoa with the average percentage obtained each being $80.75 \pm 1.55\%$.

Keywords: Lukas Fish, Viability, Cryopreservation, Egg Yolk.

1. PENDAHULUAN

Ikan lukas (*Puntius bramoides* Val) merupakan salah satu spesies ikan air tawar asli Indonesia yang telah banyak dimanfaatkan sebagai ikan konsumsi oleh masyarakat sekitar karena kandungan gizinya dan merupakan sumber protein hewani. Dengan 31 spesies ikan lainnya, ikan lukas dapat dijumpai di aliran Sungai Serayu-Jawa Tengah (Umiyati, 2005). Ikan lukas memiliki kandungan nutrisi yang cukup tinggi untuk tiap 100g bahan seperti air (66g), kalori (198kal), protein (19g), lemak (13g), serta mengandung zat-zat kalsium, fosfor, besi, vitamin A dan B1 yang dibutuhkan tubuh manusia (Kemenkes RI, 2019). Ikan lukas mempunyai nilai jual di pasar yang tergolong lebih murah. Ikan lukas dapat dijadikan sebagai alternatif pilihan ikan konsumsi masyarakat dikarenakan keunggulan lain dari ikan ini, yaitu tingkat kematangan gonad yang relatif cepat dibandingkan spesies *family Cyprinidae* lainnya (Sukumasavin, 2008).

Tingginya aktivitas manusia di sepanjang Sungai Serayu menyebabkan terjadinya degradasi habitat karena kerusakan lingkungan, di antaranya banyaknya para penambang pasir, penangkapan ikan yang kurang terkontrol, dan limbah rumah tangga. Ikan lukas di Sungai Serayu saat ini dilaporkan telah mengalami eksploitasi berlebih dan kondisi sungai juga telah terindikasi mengalami degradasi di sebagian besar daerah aliran sungainya. Menurut Krismono *et al.* (2013), degradasi habitat yang terjadi di Sungai Serayu dimulai dari segmen hulu sampai hilir. Kerusakan habitat di perairan umum tentu mengakibatkan kelangkaan bagi beberapa spesies ikan (Suwelo, 2005). Salah satunya ikan lukas yang mengalami penurunan produksi pada tahun 2005 berada pada urutan kelima yaitu sebesar ± 140 ton, namun pada tahun 2009 produksi ikan ini mengalami penurunan drastis

menjadi hanya 63,1 ton. Pemenuhan permintaan benih dalam jumlah besar dan berkelanjutan menjadi kendala dalam proses produksi ikan lukas, sehingga dibutuhkan solusi alternatif yang dapat menyelesaikan permasalahan tersebut. Alternatif yang bisa dilakukan untuk menyediakan benih ikan lukas sepanjang tahun yaitu melalui penyimpanan spermatozoa yang dapat dilakukan dengan teknik kriopreservasi (Setyono, 2009).

Kriopreservasi merupakan metode yang dapat digunakan untuk menyimpan materi genetik dalam keadaan beku. Metode kriopreservasi dapat memungkinkan untuk menyimpan materi genetik (seperti spermatozoa dan sel telur) dalam waktu yang lama (Avis & Wagner 1991). Menurut Sunarma (2007) teknik kriopreservasi memiliki beberapa manfaat antara lain mempertahankan keragaman genetik suatu spesies, sinkronisasi reproduksi secara buatan, serta sebagai salah satu bentuk konservasi *ex-situ*. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kriopreservasi salah satunya adalah penggunaan kombinasi ekstender dan krioprotektan. Kuning telur dapat digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler alami pada spermatozoa ikan karena mengandung lipoprotein untuk mencegah terjadinya *cold shock* pada saat proses pembekuan (Vishwanath dan Shannon, 2000). Penggunaan kuning telur juga lebih murah dan mudah didapatkan. Penelitian kriopreservasi menggunakan kuning telur telah diteliti antara lain pada spermatozoa ikan patin jambal (*Pangasius djambal*) (Sularto *et al.*, 2013), dan spermatozoa ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) (Abinawanto *et al.*, 2013).

2. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Pengoleksian Sperma

Induk jantan yang akan diambil spermanya, terlebih dahulu disuntik dengan menggunakan GnRH analog (Ovaprim, Syndell) dengan dosis 0,5 mL/kg Berat Badan, penyuntikkan dilakukan secara intramuskular. Sperma yang akan digunakan diperoleh dengan cara *stripping* pada bagian abdomen. Sebelum dilakukan *stripping*, bagian abdomen dan urogenital terlebih dahulu dibersihkan dengan kertas tisu untuk mencegah kontaminasi sperma dari urin, lendir dan feses. Sperma yang keluar ditampung terlebih dahulu dalam *disposable syringe* tanpa jarum dengan skala 1 mL.

2.2 Pembuatan Larutan

2.2.1 Ekstender Glukosa

Metode yang digunakan pada pengumpulan data dalam program aplikasi ini adalah sebagai berikut: Pembuatan ekstender glukosa berdasarkan Jodun *et al.* (2006) dengan komposisi 54,04 g $C_6H_{12}O_6/l$ dan 1,70 g KCl/l . Stok ekstender glukosa dibuat dengan melarutkan 5,04 g $C_6H_{12}O_6$ dan 0,17 g KCl ditambahkan akuades hingga 100 mL.

2.2.2 Larutan Aktivator

Pembuatan larutan aktivator dilakukan dengan cara melarutkan 45 mM $NaCl$ (0,26 g $NaCl$, berat molekul 58 g/mol), 5 mM KCl (0,037 g KCl , berat molekul 74,5 g/mol), dan 30 mM $Tris$ (0,36 g $C_4H_{11}NO_3$, berat molekul 121 g/mol) dalam 100 mL akuades (Sunarma 2007).

2.2.3 Larutan Eosin-Y 0,5%

Pembuatan larutan eosin-Y 0,5% dengan cara melarutkan eosin-Y sebanyak 0,5 mL ke dalam akuades hingga volumenya 100 mL (WHO 1988).

2.2.4 Larutan Pengencer

Pengencer yang digunakan terdiri atas ekstender berupa larutan glukosa, metanol, dan kuning telur. Pembuatan larutan tersebut dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama adalah memisahkan kuning telur dari yolk sac menggunakan kertas saring (Whatman nomor 1). Tahap kedua ialah mencampurkan larutan ekstender glukosa dengan kuning telur sesuai komposisi yang telah ditentukan. Campuran dihomogenkan dengan cara menghisap dan mengeluarkan campuran sebanyak 10 kali dengan menggunakan pipet mikro. Campuran tersebut dibuat dalam beberapa cryotube yang telah diberi label, kemudian disimpan dalam lemari pendingin bersuhu $6^{\circ}C$. Metanol dimasukkan terakhir sebelum penambahan sperma ke dalam cryotube. Perbandingan sperma dan

larutan pengencer yang akan digunakan, yaitu 1:9 (Sunarma, 2007).

2.3 Ekuilibrasi

Ekuilibrasi dilakukan berdasarkan modifikasi metode Lahnsteiner *et al.* (2002), *cryotube* yang berisi sampel sperma disimpan dalam lemari es pada suhu 6°C selama 10 menit.

2.4 Pembekuan (*Freezing*)

Proses pembekuan dilakukan dalam *deep freezer* pada suhu -34°C selama 48 jam.

2.5 Pencairan (*Thawing*)

Pencairan (*Thawing*) akan dilakukan dalam waterbath dengan suhu 40°C selama 30 detik (Jodun *et al.* 2006). Sperma yang telah dicairkan dianalisis kembali secara mikroskopis untuk mengetahui presentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas.

2.6 Evaluasi Persentase Viabilitas Sperma Pascakriopreservasi

Penghitungan viabilitas spermatozoa akan dilakukan dengan cara mengambil sperma sebanyak 10 µl hasil pengenceran 100 kali ditetaskan diatas kaca objek dan dicampur dengan 10 µl larutan eosin-Y 0,5%, lalu ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10 x 40. Spermatozoa hidup tidak akan terwarnai oleh larutan eosin-Y 0,5%, sedangkan spermatozoa yang mati akan tampak berwarna merah karena telah terwarnai (Arifiantini *et al.* 2005). Spermatozoa yang diamati sebanyak 100 sel. Rumus penghitungan persentase viabilitas yaitu:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\Sigma \text{ spermatozoa total} - \Sigma \text{ spermatozoa terwarnai eosin}}{\Sigma \text{ spermatozoa total}} \times 100\% \quad (1)$$

2.7 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis statistik pada data dilakukan dengan menggunakan *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for Windows*. Data-data yang diperoleh ditabulasikan kemudian dianalisis menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Karakteristik Fisik dan Kimia Sperma Ikan Lukas

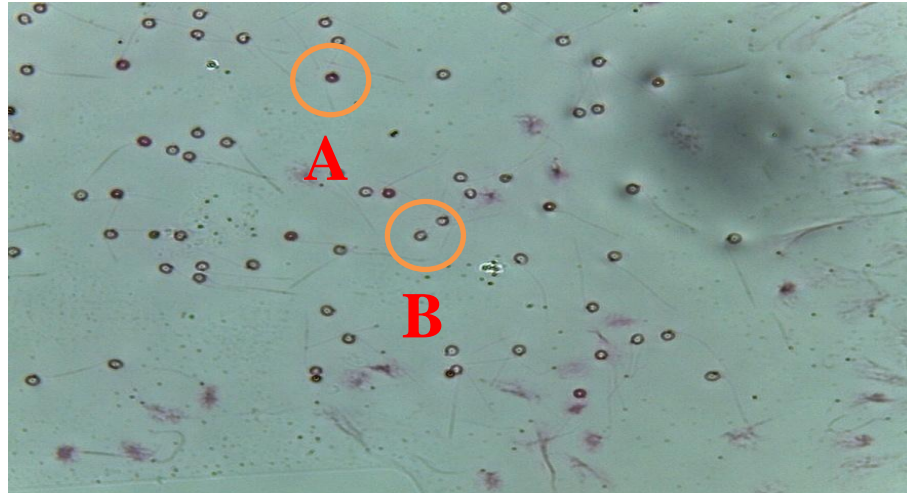
Pengamatan karakteristik fisik dan kimia sperma ikan lukas meliputi volume, pH, warna, dan bau sperma. Berikut ini merupakan data karakteristik sperma ikan lukas yang masing-masing dilakukan sebanyak empat kali pengulangan dengan beberapa individu yang berbeda (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik Fisik Dan Kimia Sperma Ikan Lukas

Individu	Volume (mL)	pH	Warna	Bau
1	0,45	8,0	Putih susu	Amis
2	0,52	8,5	Putih susu	Amis
3	0,74	8,2	Putih susu	Amis
4	0,80	8,2	Putih susu	Amis
Rata-rata	0,63	8,2	Putih susu	Amis
SD	0,17	0,21	-	-

3.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa Pascakriopreservasi

Evaluasi mikroskopis yang dilakukan untuk menghitung persentase viabilitas spermatozoa ikan lukas pascakriopreservasi 48 jam. Pada pengamatan viabilitas spermatozoa ikan lukas terlihat spermatozoa hidup (*viable sperm*) yaitu yang tidak terwarnai eosin, sedangkan spermatozoa mati (*non viable sperm*) yang dapat terwarnai larutan eosin (Gambar 1). Hal tersebut terjadi karena membran spermatozoa yang mati kehilangan fungsi permeabilitasnya sehingga zat warna eosin dapat melewati membran dengan mudah (Arifiantini *et al.* 2005).



Gambar 1. Viabilitas Spermatozoa

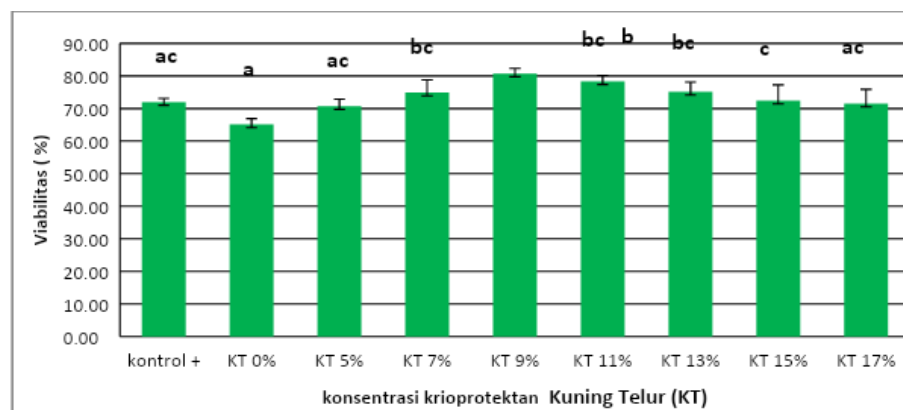
Keterangan:

(a) Spermatozoa mati

(b) spermatozoa hidup

[sumber: dokumentasi pribadi.]

Data persentase viabilitas spermatozoa ikan lukas (*Puntius bramoides* Val) 48 jam pascakriopreservasi dapat dilihat pada gambar 2. Berdasarkan uji Anava ($P < 0,05$), menunjukkan bahwa adanya perlakuan menggunakan kuning telur sebagai krioprotektan memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas spermatozoa. Hal tersebut dapat ditunjukkan dengan adanya perbedaan nyata antara kontrol positif yaitu menggunakan *carboxymethyl cellulose* (CMC) 1% dengan kontrol negatif tanpa kuning telur (0%) dan perlakuan dengan kuning telur (5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 17%). Perlakuan dengan menggunakan kuning telur konsentrasi 0% memiliki nilai viabilitas paling rendah yaitu $65,13 \pm 1,79\%$, sedangkan perlakuan dengan kuning telur 9% merupakan konsentrasi optimum yaitu $80,75 \pm 1,55\%$ (Gambar 2). Nilai-nilai tersebut menunjukkan bahwa penambahan kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler alami dapat mempengaruhi persentase viabilitas spermatozoa.



Gambar 2. Persentase Viabilitas Spermatozoa Pascakriopreservasi

Penurunan persentase viabilitas spermatozoa ikan lukas 48 jam pascakriopreservasi dibandingkan dengan spermatozoa segar dapat disebabkan oleh terbentuknya kristal es ekstraseluler dan intraseluler serta *cold shock*. Hal tersebut dinyatakan oleh Li jun *et al.* (2006) bahwa pembentukan kristal es merupakan penyebab utama kerusakan membran sel pada proses kriopreservasi. Kombinasi antara metanol sebagai krioprotektan intraseluler dengan kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler merupakan kombinasi krioprotektan yang baik. Hal tersebut

dapat mempengaruhi viabilitas spermatozoa karena berkaitan dengan perlindungan dari dalam dan luar sel spermatozoa. Kombinasi kedua krioprotektan tersebut saling melengkapi dan membentuk perlindungan spermatozoa ikan lukas selama proses kriopreservasi. Metanol sebagai krioprotektan intraseluler berfungsi menurunkan titik beku dan menghambat pembentukan kristal es intraseluler. Kuning telur memiliki kemampuan untuk melindungi spermatozoa dari terjadinya *cold shock* pada saat proses kriopreservasi. Kandungan lesitin (fosfatidil kolin) dapat bersifat sebagai membran *coating* yang berfungsi mempertahankan konfigurasi normal fosfolipid bilayer yang merupakan susunan utama membran sel spermatozoa (Arifiantini *et al.* 2005).

4. KESIMPULAN

Penggunaan beberapa konsentrasi kuning telur (0%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 17%) sebagai krioprotektan ekstraseluler alami mampu mempengaruhi kualitas viabilitas spermatozoa ikan lukas (*Puntius bramoides* Val) 48 jam pascakriopreservasi. Penggunaan kuning telur konsentrasi 9% merupakan konsentrasi optimum dalam menjaga viabilitas spermatozoa ikan lukas dengan rata-rata persentase yang diperoleh sebesar $80,75 \pm 1,55\%$.

REFERENCES

- Abinawanto, S. Rahayu, R. Lestari. (2013). Cryopreservation of Java barb (*Barbonymus gonionotus*) spermatozoa using egg yolk as a cryoprotectant. *Global Veterinary* 10(3): 318--321.
- Arifiantini, R. I., T. L. Yusuf & O. Indah. (2005). Kaji banding dua teknik pengemasan menggunakan tiga macam pengencer untuk pembekuan semen sapi Friesian Holstein (FH). *Seminar Nasional Teknologi Perternakan dan Veteriner*. 366--376.
- Bearden, H.J., J.W. Fuquay & S.T. Willard. (2004). *Applied animal reproduction*. 6th ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey: xvi + 427 hlm.
- Bergeron, A., M.H. Crete, Y. Brindel & P. Manjunath. (2004). Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction* 70: 708--717.
- Fujaya, Y. (2002). *Fisiologi ikan: Dasar pengembangan teknologi perikanan*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanudin, Makassar: vii + 204 hlm.
- Kasim, K., C. Umar, P.S. Sulaiman & N. Zulfia. (2012). Makanan dan reproduksi ikan lukas (*Dangila cuvieri*, Valenciennes 1842) di perairan waduk gajah mugkur Wonogiri. *BAWAL* 4(2): 113--120.
- Routray, P., D. K. Verma, S. K. Sarkar & N. Sarangi. (2007). Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. *Fish Physiology Biochemistry* 10: 1--15.
- Rurangwa, E., D. E. Kime, F. Ollevier & J. P. Nash. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1--28.
- Setyono, B. (2009). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Bahan pada Pengencer Sperma Ikan "Skim Kuning Telur" terhadap Laju Fertilisasi, Laju Penetasan dan Sintasan Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). *Gamma* 5(1): 01--12.
- Sularto, E. Tahapari, W. Hadie & I. Nurlela. (2013). Penggunaan kuning telur bebek sebagai ekstender pada proses kriopreservasi sperma ikan patin jambal. *Konferensi Akuakultur Indonesia* 220--225.
- Sukumasavin, N. (2008). *Advanced freshwater aquaculture: Fish reproduction*. Inland Fisheries Research and Development Bureau, Departement of Fisheries, Thailand: 133--159 hlm.
- Sunarma, A. (2007). *Kriopreservasi sperma ikan nilam (Osteochilus hasselti) menggunakan ekstender dan krioprotektan berbeda*. Tesis S2-Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto: xvii + 55 hlm.
- Umiyati, T. (2005). *Studi Pakan Alami Ikan Senggaringan (Mystus nigriceps) dan Ikan Lukas (Puntius bramoides) di Perairan Bendung Gerak Serayu Kabupaten Banyumas*. Skripsi (Tidak Dipublikasi). Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Vishwanath, R. & P. Shannon. (2000). Storage of Bovine Semen in Liquid Frozen State. *Animal Reproduction Science* 62: 23--53.