

Pengaruh Variasi Konsentrasi Kuning Telur terhadap Abnormalitas Sperma *Puntius bramoides* Pascakriopreservasi 48 Jam

Primasari Pertiwi^{1*}, Abinawanto²

^{1*}Fakultas MIPA, Program Studi Biologi, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia

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

(* : primasari.pertiwi@fmipa.unila.ac.id)

Abstrak—Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi kuning telur sebagai krioprotektan alami yang efektif untuk kriopreservasi serta menganalisis kualitas spermatozoa ikan *Puntius bramoides* (ikan lukas) 48 jam pascakriopreservasi. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 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 abnormalitas spermatozoa ikan lukas 48 jam pascakriopreservasi. Penggunaan kuning telur konsentrasi 9% merupakan konsentrasi optimum dalam menurunkan persentase abnormalitas spermatozoa ikan lukas dengan rata-rata persentase yang diperoleh sebesar $26,13 \pm 1,49\%$.

Kata kunci: *Puntius bramoides*; kriopreservasi; Abnormalitas spermatozoa; kuning telur.

Abstract—The study aims to determine the effect of several concentrations of egg yolk as an effective natural cryoprotectant for cryopreservation and to analyze the quality of spermatozoa of *Puntius bramoides* fish (lukas fish) 48 hours after cryopreservation. This study used a Completely Randomized Design (CRD) with 9 treatments and 4 replications. The concentrations of egg yolk used as cryoprotectants were 0% (negative control), 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 17%, and the use of *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1% 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 affect ($P < 0.005$) the abnormalities of spermatozoa of lukas fish 48 hours after cryopreservation. The use of 9% egg yolk concentration is the optimum concentration in reducing the percentage of abnormality of sperm in lukas fish with an average percentage obtained of $26.13 \pm 1.49\%$.

Keywords: *Puntius bramoides*; cryopreservation; abnormality of sperm; egg yolk.

1. PENDAHULUAN

Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan sel, jaringan, atau organ pada suhu sangat rendah (biasanya -196°C dalam nitrogen cair) untuk menghentikan seluruh aktivitas biologis dan metabolik sementara waktu tanpa merusak struktur dan fungsi sel. Pada bidang perikanan, kriopreservasi digunakan sebagai upaya pelestarian plasma nutfah dan peningkatan efisiensi reproduksi ikan melalui penyimpanan sperma jangka panjang (Isnansetyo & Kurniasuty, 2016). Namun, proses pembekuan dan pencairan kembali dapat menyebabkan kerusakan struktural pada sperma, yang ditandai oleh penurunan motilitas, viabilitas, serta peningkatan abnormalitas morfologis.

Salah satu faktor penting dalam keberhasilan kriopreservasi adalah penggunaan krioprotektan, yaitu senyawa yang melindungi sel dari kerusakan akibat pembentukan kristal es selama proses pembekuan. Kuning telur merupakan salah satu krioprotektan eksternal alami yang telah banyak digunakan pada kriopreservasi sel sperma karena kandungan lipid, protein, dan lesitin yang berfungsi melindungi membran sel sperma dari stres osmotik dan fisik (Watson, 2000). Senyawa fosfolipid dalam kuning telur membentuk lapisan pelindung di sekitar membran sel, sehingga mampu menjaga integritas sel selama pembekuan dan pencairan (Matsumoto *et al.*, 2001).

Puntius bramoides (ikan lukas) merupakan spesies ikan air tawar yang memiliki potensi sebagai ikan konsumsi. Dalam upaya pelestarian dan pemanfaatan genetiknya, kriopreservasi sperma menjadi alternatif strategi konservasi yang efisien. Namun, keberhasilan kriopreservasi sangat bergantung pada jenis dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan, karena konsentrasi yang tidak sesuai dapat menyebabkan toksisitas dan kerusakan sel sperma (Shaliutina *et al.*, 2012). Oleh karena itu, evaluasi abnormalitas morfologis sperma setelah kriopreservasi merupakan indikator penting dalam menentukan efektivitas perlakuan krioprotektan.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi kuning telur dapat memberikan efek yang berbeda terhadap kualitas sperma yang dibekukan. Konsentrasi yang terlalu rendah tidak cukup melindungi sperma, sementara konsentrasi yang terlalu tinggi dapat mengganggu proses difusi zat dan menyebabkan peningkatan abnormalitas (Moussa *et al.*, 2002). Oleh sebab itu, penentuan konsentrasi kuning telur yang optimal sangat penting untuk meminimalkan kerusakan sel sperma, terutama dalam hal abnormalitas morfologis kepala, leher, dan ekor.

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 C₆H₁₂O₆/l dan 1,70 g KCl/l. Stok ekstender glukosa dibuat dengan melarutkan 5,04 g C₆H₁₂O₆ 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 C₄H₁₁NO₃, 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°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 abnormalitas.

2.6 Evaluasi Persentase Abnormalitas Sperma Pascakriopreservasi

Penghitungan abnormalitas spermatozoa 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 yang diamati sebanyak 100 sel. Rumus penghitungan persentase abnormalitas sebagai berikut:

$$\% \text{ abnormalitas} = \frac{\Sigma \text{ spermatozoa abnormal}}{\Sigma \text{ spermatozoa total}} \times 100\% \quad (1)$$

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 Evaluasi Abnormalitas sperma segar ikan lukas secara mikroskopis

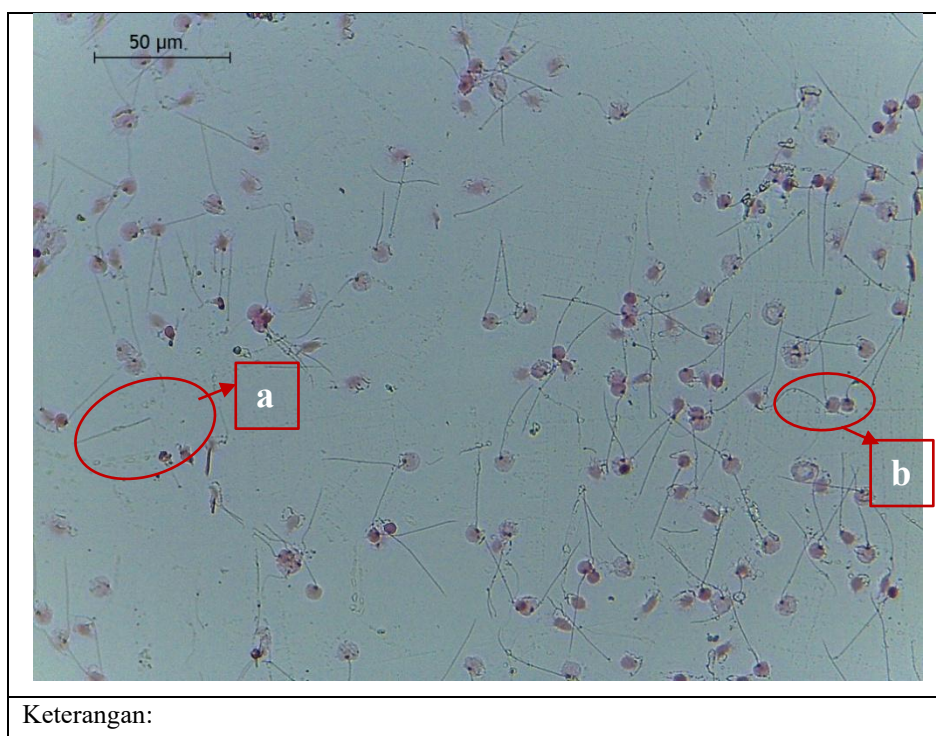
Parameter yang diukur secara mikroskopis yaitu abnormalitas dari sperma ikan lukas. Rata-rata persentase motilitas yang diperoleh dalam penelitian ialah $26 \pm 3,34\%$. Spermatozoa yang baik untuk dikriopreservasi adalah spermatozoa normal yang memiliki nilai presentase $>70\%$ (Azizah & Arifiantini, 2009). Nilai rata-rata persentase abnormalitas yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan bahwa spermatozoa ikan lukas memenuhi syarat spermatozoa yang baik dan dapat dikriopreservasi. Spermatozoa ikan lukas diamati dengan menggunakan preparat ulasan. Abnormalitas spermatozoa menunjukkan kelainan bentuk pada spermatozoa yaitu kelainan pada kepala atau ekor. Kelainan tersebut dapat mempengaruhi spermatozoa untuk melakukan fertilisasi. Spermatozoa yang abnormal memiliki tingkat keberhasilan yang rendah dalam fertilisasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi nilai abnormalitas maka semakin kecil peluang terjadinya fertilisasi (Rurangwa *et al.* 2004).

3.2 Persentase abnormalitas spermatozoa 48 jam pascakriopreservasi

Hasil uji statistik menggunakan uji Anava ($P < 0,05$) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa ikan lukas menunjukkan bahwa, adanya perlakuan menggunakan kuning telur sebagai krioprotektan memberikan pengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa. Hal tersebut 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%).

Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan lukas 48 jam pascakriopreservasi dapat dilihat pada gambar 2. Perlakuan dengan menggunakan kuning telur konsentrasi 0% memiliki nilai abnormalitas paling tinggi yaitu $40 \pm 3,94\%$, sedangkan perlakuan dengan kuning telur 9% memiliki nilai abnormalitas terendah yaitu $26,13 \pm 1,49\%$. Spermatozoa dengan nilai abnormalitas tersebut tergolong spermatozoa yang baik. Hal tersebut diungkapkan oleh Azizah dan Arifiantini (2009) bahwa kriteria spermatozoa yang baik adalah spermatozoa yang memiliki nilai rata-rata abnormalitas di bawah 30%.

Abnormalitas spermatozoa ikan lukas 48 jam pascakriopreservasi yang ditemukan pada penelitian ini lebih banyak ditemukan pada ekor, yaitu ekor yang terputus dan melingkar (Gambar 1). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Kyoung Ho Kang *et al.* (2004) bahwa spermatozoa pascakriopreservasi mengalami peningkatan abnormalitas pada bagian ekor, yaitu ekor yang terputus dan melingkar. Ekor spermatozoa merupakan bagian yang sangat rentan terhadap kerusakan karena bentuknya yang tipis dan memanjang. Selain itu, penanganan sampel spermatozoa selama pengamatan yang dilakukan juga dapat menyebabkan ekor spermatozoa terputus.



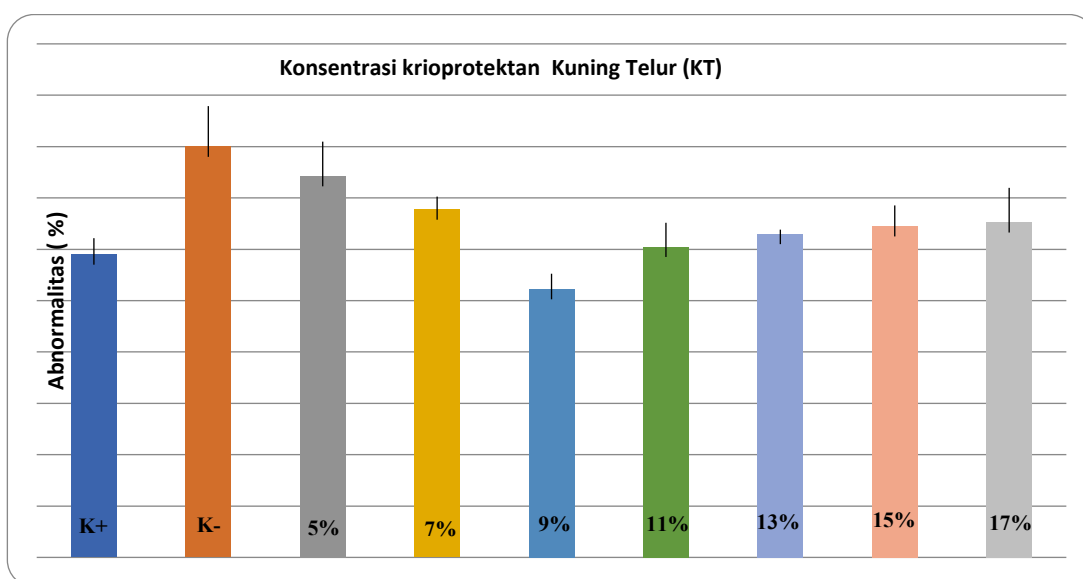
(a) Ekor putus

(b) Ekor melingkar

[sumber: dokumentasi pribadi.]

Gambar 1. Abnormalitas spermatozoa

Karakteristik spermatozoa ikan lukas yang merupakan ikan dari *family Cyprinidae* antara lain tidak memiliki akrosom, bentuk kepala spermatozoa seperti bola, bagian tengah spermatozoa (*mid-piece*) tereduksi, hanya memiliki satu flagella dengan panjang sekitar 36--60 μm (Rurangwa *et al.*, 2004). Morfologi spermatozoa abnormal yang dapat diamati antara lain abnormalitas kepala dan ekor. Abnormalitas kepala terdiri dari bentuk kepala besar (*macrocephalus*), bentuk kepala kecil (*microcephalus*), dan spermatozoa dengan dua kepala, sedangkan abnormalitas ekor antara lain terdiri dari ekor melingkar, ekor patah, dan ekor bercabang (Toelihere 1981).



Gambar 2. Persentase abnormalitas spermatozoa pascakriopreservasi

Berdasarkan data hasil penelitian, nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa ikan lukas 48 jam pascakriopreservasi, mengalami peningkatan dibandingkan dengan nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa segar. Peningkatan persentase tersebut dapat terjadi karena pengaruh perubahan sifat fisika dan kimia selama kriopreservasi, seperti perubahan suhu, tekanan osmotik, perubahan volume sel sehingga spermatozoa mengalami kerusakan (Muchlisin, 2005). Kerusakan spermatozoa ikan biasa terjadi pada bagian kepala dan ekor. Kerusakan bagian kepala yang biasa terjadi antara lain karena sel mengalami pembengkakan atau pengerutan akibat perbedaan tekanan osmotik intraseluler dan ekstraseluler, sedangkan kerusakan ekor antara lain terputusnya bagian ekor atau ujung ekor melingkar (Toelihere, 1981). Perubahan struktur spermatozoa dan kerusakan yang terjadi selama kriopreservasi dapat diminimalisasi dengan menggunakan kombinasi metanol sebagai krioprotektan intraseluler dengan kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler. Larutan pengencer diperlukan untuk menurunkan titik beku sampel sehingga mencegah terjadinya dehidrasi sel dan mampu mempertahankan struktur spermatozoa walaupun telah mengalami perubahan suhu ekstrem (Jamieson, 1991).

4. KESIMPULAN

Penggunaan beberapa konsentrasi kuning telur (0%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 17%) sebagai krioprotektan ekstraseluler alami mampu mempengaruhi abnormalitas spermatozoa ikan lukas (*Puntius bramoides* Val) 48 jam pascakriopreservasi. Persentase abnormalitas spermatozoa ikan lukas terendah ($26,13 \pm 1,49\%$) ditunjukkan oleh konsentrasi krioprotektan kuning telur 9%.

REFERENCES

- Azizah & R.I. Arifiantini.2009. Kualitas Semen Beku Kuda pada Pengencer Susu Skim dengan Konsentrasi Gliserol yang Berbeda. *Veteriner* **10**(2) : 63--70.
- Isnansetyo, A., & Kurniastuty, A.2016. *Bioteknologi Perikanan: Dasar dan Aplikasi*. Gadjah Mada University Press.
- Jamieson, B.G.M. 1991. *Fish evolution and systematic: Evidence from spermatozoa*. 1st ed. Cambridge University Press, New York: xv + 319 hlm.
- Jodun, W. A., K. King & P. Farrell. 2006. Methanol and egg yolk as cryoprotectants for atlantic salmon spermatozoa. *North America Journal of Aquaculture* **69**: 36--40.
- Kyoung, H.K., K.H. Kho, Z.T. Chen, J.M. Kim, Y.H. Kim & Z. F. Zhang. 2004. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunter, 1877) sperm. *Aquaculture Research* **35**: 1429--1433.
- Lahnsteiner, F., N. Mansour & T. Weismann. 2002. The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). *Cryobiology* **45**: 195--203.
- Matsumoto, S., Sakai, R., & Uemura, T.2001. Role of Egg Yolk Lipoproteins in Cryopreservation of Fish Spermatozoa. *Cryobiology*, **43**(3), 221--227.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, **57**(6), 1695--1706.
- Muchlisin, Z.A. 2005. Review: Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas* **6**(1): 12--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.
- Shaliutina, A., Gazo, I., & Cosson, J. 2012. Comparison of cryoprotectants for cryopreservation of common carp sperm. *Aquaculture International*, **20**, 99--111.
- Sunarma, A. 2007. *Kriopreservasi sperma ikan nilem (Osteochilus hasselti) menggunakan ekstender dan krioprotektan berbeda*. Tesis S2-Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto: xvii + 55 hlm.
- Toelihere, M. R. 1981. *Fisiologi reproduksi pada ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung: 372 hlm.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, **60--61**, 481--492.