

<b>Full Paper</b>
-------------------

**KOMBINASI EFEKTIF EKSTENDER DAN KRIOPROTEKTAN PADA  
KRIOPRESERVASI SPERMA IKAN NILEM  
(*Osteochilus hasseltii Valenciennes, 1842*)**

**THE EFFECTIVE COMBINATION OF EXTENDER AND CRYOPROTECTANT ON SPERM  
CRYOPRESERVATION OF NILEM  
(Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii Valenciennes, 1842*)**

A. Sunarma<sup>\*)\*)</sup>\*, D.W.B. Hastuti<sup>\*)</sup>, D.M. Saleh<sup>\*\*\*)</sup>, dan Y. Sistina<sup>\*)</sup>

**Abstract**

Cryopreservation technology of fish sperm has been developed to prolong gamete viability. Combination of two extenders (ringer or glucose) and two cryoprotectants (DMSO or methanol) on three concentrations have studied to sperm cryopreservation of nilem. Nilem fish brooder induced by GnRHa and domperidone combination. Sperm was diluted in extender 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 3 minutes and then plunged into liquid nitrogen, where they were stored for 1 weeks. Sperm was thawed at temperature 39 – 40 °C for 10 – 15 sec. and was used to fertilize 100 – 200 eggs per *straw*. The highest percentage of post-thawed sperm was combination ringer and DMSO 10% (87.50 ± 5.00%) and the lowest was combination ringer and methanol 5% (23.75 ± 4.79%). The highest hatching rate fertilized by post-thawed sperm was combination ringer and DMSO 15% (54.98 ± 28.61%) and the lowest was combination glucose and DMSO 15% (6.54 ± 3.32%). The study proven combination of ringer extender and DMSO cryoprotectant effective for cryopreservation of Indonesian silver sharkminnow fish sperm. Therefore, fish sperm cryopreservation with nilem as a representative model could be developed to extend on other Cyprinidae.

**Key words: cryopreservation, sperm, sperm extender, nilem fish**

**Pengantar**

Teknologi kriopreservasi (penyimpanan pada temperatur rendah) telah dikembangkan secara ekstensif untuk tujuan memperpanjang kemampuan hidup gamet. Secara teori, pada temperatur sangat rendah seperti pada nitrogen cair (-196 °C) semua aktifitas biologi berhenti sehingga dapat dianggap perjalanan waktu jadi berhenti. Menurut Chao & Liao (2001), penyimpanan pada temperatur di bawah -130 °C sudah dapat

mempertahankan stabilitas sel untuk waktu berabad-abad sedangkan pada temperatur di atas -80 °C kebanyakan sel yang disimpan tidak stabil untuk waktu yang lama. 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).

<sup>\*)</sup> Program Studi Biologi, Program Pascasarjana, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

<sup>\*\*)</sup> BBP BAT Sukabumi, Jl. Selabintana 37 Sukabumi 43114

<sup>\*\*\*)</sup> Fakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

<sup>\*)</sup> Penulis untuk korespondensi: E-mail: juragan@sunarma.net. Telp. 08164638479

Pengawetan gamet, khususnya spermatozoa, sudah dimulai sekitar 50-an tahun lalu dan sudah sudah dikerjakan pada lebih dari 230 spesies organisme akuatik (Dong, *et al.*, 2007). Mayoritas publikasi mengenai pengembangan teknologi ini dikembangkan pada beberapa kelompok ikan akuakultur penting, seperti salmonid, carp, lele, dan tilapia dan dari kelompok molluska yang ekonomis, seperti abalone dan oyster (Rana, 1995; Tiersch, 2006). Kriopreservasi sperma ikan terutama dilakukan untuk konservasi spesies secara *ex-situ* baik ikan yang terancam punah akibat lingkungan atau penyakit maupun ikan hasil program pemuliaan (*selective breeding*) dan untuk mengontrol reproduksi pada budidaya ikan diantaranya memungkinkan untuk sinkronisasi ketersediaan gamet jantan dan betina, memanfaatkan semua sperma yang tersedia secara efisien, memudahkan transport gamet, memudahkan upaya fertilisasi silang dan memperpanjang waktu pemijahan (Lubzens, *et al.*, 1997; Suquet, *et al.*, 2000; Billard & Zhang, 2001).

Proses kriopreservasi sperma dapat meliputi: koleksi dan pengenceran sperma dengan bahan pengencer (*ekstender*), penambahan bahan pengawet (*krioprotektan*), pengepakan gamet pada wadah penyimpanan (*filling*), equilibrasi, penyimpanan pada nitrogen cair (*freezing*), pengenceran kembali (*thawing*), fertilisasi dan produksi tahap awal daur hidup larva ikan untuk pendugaan keberhasilan kriopreservasi. Protokol pada masing-masing tahapan yang sudah dipublikasikan menunjukkan adanya keberhasilan kriopreservasi yang beragam dan belum terdapat standarisasi yang sistematis dan terintegrasi yang dapat digunakan secara pasti (Dong, *et al.*, 2007). Kombinasi ekstender dan krioprotektan yang berbeda banyak digunakan pada berbagai penelitian, diantaranya: ekstender madu dengan DMSO atau methanol (Sunarma, *et al.*, 2007), ringer dengan DMSO, etanol, metanol atau gliserol (Muchlisin, *et al.*,

2004), larutan Kurokura dengan DMSO (Linhart, *et al.*, 2000), glukosa 350 mM dengan metanol (Horvath, *et al.*, 2007) dan modifikasi larutan Kurokura, sukrosa atau trehalosa dengan *dimethylacetamide* (Warnecke & Pluta, 2003).

Penelitian dilakukan untuk mendapatkan kombinasi antara ekstender (ringer atau glukosa) dengan krioprotektan (DMSO dan metanol) pada beberapa konsentrasi berbeda pada kriopreservasi sperma ikan nilam (*Osteochilus hasseltii*). Penelitian ini menggunakan ikan nilam sebagai ikan model yang mewakili ikan-ikan Cyprinidae. Ikan ini dipilih karena memiliki ukuran dewasa yang relatif kecil (100 – 200 gram/ekor) dengan volume sperma yang banyak ( $\pm 2 - 2,5$  mL/ekor induk setelah diinduksi) dan dapat memijah sepanjang tahun. Kombinasi efektif yang dihasilkan pada penelitian ini dapat digunakan lebih lanjut pada pengawetan sperma ikan-ikan Cyprinidae.

## Bahan dan Metode

### *Penanganan Induk dan Fertilisasi*

Induk jantan dan betina nilam berasal dari pembudidaya di daerah Purwokerto. Pemilihan induk didasarkan pada kondisi visual, yaitu: pada betina dengan ukuran perut yang sudah membesar dan lembek sedangkan pada jantan ditandai dengan adanya cairan sperma yang keluar ketika dilakukan pengurutan pada bagian perut secara perlahan. Untuk merangsang produksi sperma yang lebih banyak pada jantan atau kematangan akhir telur pada betina, setiap induk diberi rangsangan dengan injeksi secara intra-muskular menggunakan kombinasi GnRHa dan domperidone (Ovaprim, Syndel) dosis 0,5 ml/kg. Induk jantan dan betina yang telah disuntik disimpan dalam wadah terpisah pada temperatur inkubasi 25 – 26 °C dan diberi aerasi selama 8 – 10 jam.

Sperma diambil dengan cara melakukan pengurutan pada bagian perut. Sperma yang keluar disedot menggunakan spuit tanpa jarum kemudian ditampung dalam wadah gelas dan disimpan dalam boks

*styrofoam* berisi cacahan es dengan temperatur 4 – 5 °C. 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 dengan cara pengurutan dan disimpan dalam wadah yang kering pada temperatur ruangan hingga digunakan pada saat fertilisasi.

Fertilisasi dilakukan dengan mencampur telur (100 – 200 butir) dengan 0,5 mL sperma segar, sperma *pra-freezing* (sebelum dimasukkan ke dalam nitrogen cair) dan sperma *pasca-thawing* (setelah mengalami pembekuan dan diencerkan kembali). Sperma segar diencerkan 10x dalam larutan ekstender (*ringer* atau glukosa) sedangkan sperma *pra-freezing* dan sperma *pasca-thawing* sesuai dengan perlakuan. Sperma *pra-freezing* 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 untuk proses penetasan dilakukan pada temperatur 26 – 27 °C.

#### *Kriopreservasi Sperma*

Sperma gabungan yang berasal dari dua induk jantan, masing-masing sebanyak 2 mL, yang menunjukkan motilitas >80% digunakan pada perlakuan. Sperma diencerkan dengan perbandingan sperma : ekstender yaitu 1 : 9 (2 mL sperma gabungan dengan 18 mL ekstender) (Horvath, *et al.*, 2003) dengan menggunakan ekstender *ringer* (6,5 g/L NaCl, 0,25 g/L KCl, 0,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> dan 0,3 g/L CaCl<sub>2</sub>) atau ekstender glukosa

(350 mM glukosa dan 30 mM tris dalam larutan *ringer*). Krioprotektan (DMSO atau methanol) ditambahkan sebanyak 5%, 10% dan 15 % pada konsentrasi akhir. Semua proses penyiapan dilakukan pada temperatur 4 – 5 °C.

Sperma dimasukkan ke dalam 0,5 mL *straw* (IMV Technology) dan ditutup dengan menggunakan kristal *polyvinil* alkohol. *Straw* disimpan pada temperatur 4 – 5 °C selama 20 menit untuk proses *equilibrasi* (Routray, *et al.*, 2006). 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 3 menit di dalam wadah *styrofoam* tertutup (Horvath, *et al.*, 2003). Setelah *vaporasi*, proses *freezing* dilakukan dengan cara memasukkan *straw* ke dalam nitrogen cair dan disimpan dalam kontainer nitrogen cair (XT34, Taylor-Wharton) selama satu minggu. *Thawing* dilakukan dengan mencelupkan *straw* ke dalam air pada temperatur 39 – 40 °C selama 10 – 15 detik (Horvath, *et al.*, 2003).

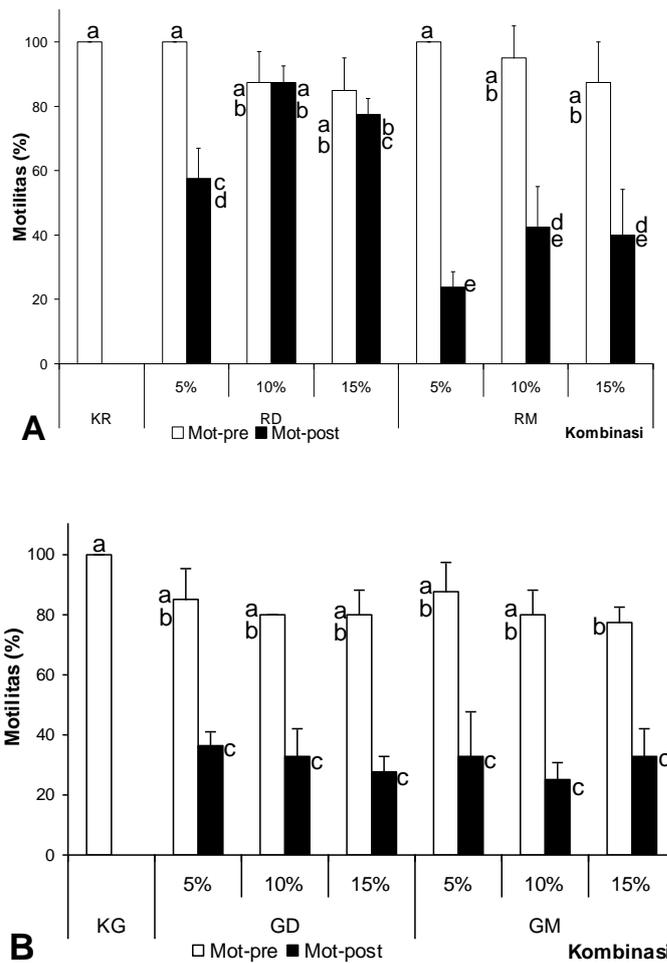
#### *Pengamatan Motilitas Spermatozoa dan Tingkat Penetasan Telur*

Motilitas sperma diamati setelah aktifasi dengan menggunakan larutan aktifator (45 mM NaCl, 5 mM KCl dan 30 mM TRIS dalam 100 mL aquades) dengan perbandingan 1 : 50 (1 µL sperma dengan 49 µL aktifator). Pengamatan motilitas dilakukan dengan meletakkan sampel sperma pada gelas obyektif di bawah mikroskop lensa obyektif 10X (ML2300, Meiji) yang disambung dengan kamera (CK3900, Meiji) dan TV monitor (Trinitron, Sony). Persentase motilitas ditentukan berdasarkan pergerakan sperma setelah diaktifasi.

Pengamatan tingkat penetasan dilakukan setelah telur hasil fertilisasi menetas (sekitar 24 jam setelah fertilisasi). Tingkat penetasan telur ditentukan berdasarkan rasio jumlah larva yang dihasilkan dengan jumlah telur yang ditetaskan.

**Rancangan Penelitian dan Analisis Data**  
 Penelitian kriopreservasi spermatozoa ikan nilam dilakukan dengan pemberian larutan ekstender dan krioprotektan pada beberapa konsentrasi. Kombinasi perlakuan menggunakan rancangan acak faktorial 2 x 2 x 3, yaitu dua jenis ekstender (ringer dan glukosa 350 mM), dua jenis krioprotektan (DMSO dan metanol) dan tiga konsentrasi krioprotektan (5%, 10% dan 15%). Setiap perlakuan dilakukan dalam empat kali ulangan.

Nilai setiap parameter pada setiap pengamatan dinyatakan dalam rata-rata ± standar deviasi. Parameter persentase motilitas spermatozoa dan tingkat penetasan telur diuji dengan menggunakan analisis keragaman (ANOVA) diikuti dengan uji Tukey untuk menentukan perbedaan setiap perlakuan pada taraf kepercayaan  $p \leq 0,05$ . Pengolahan data dilakukan dengan bantuan *software* MINITAB 13 for Windows.



Gambar 1. Motilitas spermatozoa ikan nilam pra-freezing (mot-pre) dan pasca-thawing (mot-post) pada: (a) kombinasi ringer dengan DMSO atau metanol dan (b) kombinasi glukosa dengan DMSO atau metanol. KR: Kontrol Ringer; RD: Kombinasi Ringer+DMSO; RM: Kombinasi Ringer+Metanol; KG: Kontrol Glukosa; GD: Kombinasi Glukosa+DMSO; GM: Kombinasi Glukosa+Metanol; 5, 10 dan 15: Konsentrasi krioprotektan yang digunakan (dalam %). Huruf yang berbeda pada masing-masing grafik menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ )

## Hasil dan Pembahasan

Motilitas spermatozoa *pra-freezing* antara kontrol dan perlakuan tidak berbeda nyata. Pada kombinasi ekstender ringer dengan krioprotektan DMSO (RD) atau metanol (RM), motilitas *pra-freezing* tertinggi pada RD05% dan RM05% yaitu 100% dan terendah pada RD15% yaitu  $85,00 \pm 10\%$  sedangkan pada kombinasi ekstender glukosa dengan krioprotektan DMSO (GD) atau metanol (GM), motilitas *pra-freezing* tertinggi pada GM05% yaitu  $87,50 \pm 9,57\%$  dan terendah pada GD15% dan GM10% yaitu  $80,00 \pm 8,16\%$ . Motilitas spermatozoa *pasca-thawing* bervariasi pada kombinasi ekstender ringer sedangkan pada ekstender glukosa tidak terdapat perbedaan. Pada bahan ekstender ringer (RD atau RM), motilitas *pasca-thawing* tertinggi pada RD10% yaitu  $87,50 \pm 5\%$  dan terendah pada RM05% yaitu  $23,75 \pm 4,79\%$  sedangkan pada ekstender glukosa (GD dan GM) motilitas *pasca-thawing* tertinggi pada GD05% yaitu  $36,25 \pm 4,79\%$  dan terendah pada GM10% yaitu  $25,00 \pm 5,77\%$  (Gambar 1).

Motilitas sperma pada *pra-freezing* pada dua ekstender berbeda, ringer atau glukosa, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hasil ini menunjukkan kedua bahan ekstender tersebut dapat digunakan untuk proses pengenceran sperma dan dapat berfungsi untuk mempertahankan viabilitas dan menjadi sumber nutrisi sperma. Pengenceran sperma pada kombinasi masing-masing bahan dengan krioprotektan yang berbeda juga menunjukkan tingkat motilitas yang tinggi (>80%) dan tidak berbeda nyata dengan kontrol, kecuali pada kombinasi RD15%. Namun demikian, kemampuan ekstender untuk mempertahankan fungsionalitas dan kapabilitas sperma pada proses kriopreservasi menunjukkan hasil yang berbeda. Pada penambahan krioprotektan DMSO, ekstender ringer lebih mampu mempertahankan motilitas sperma *pasca-thawing* dibandingkan dengan ekstender glukosa sedangkan penambahan

krioprotektan metanol, tidak terdapat perbedaan motilitas sperma *pasca-thawing* pada kedua bahan ekstender.

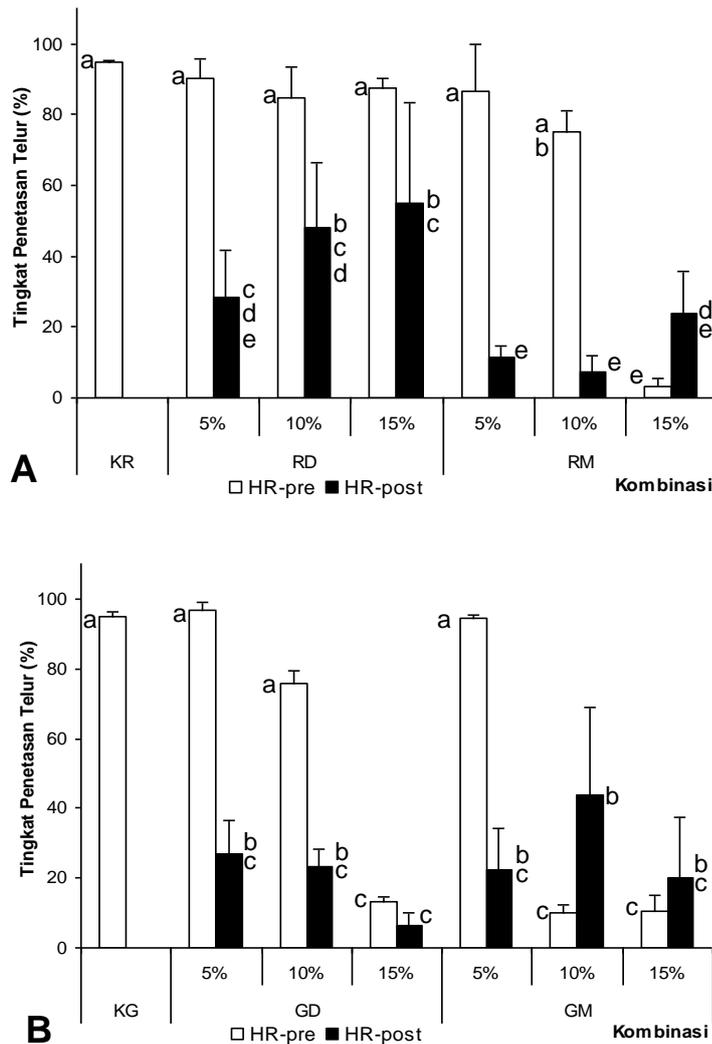
Pada kombinasi ekstender ringer dengan krioprotektan DMSO (RD) atau metanol (RM), tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma *pra-freezing* tertinggi pada RD05% yaitu  $90,74 \pm 5,44\%$  dan terendah pada RM15% yaitu  $3,39 \pm 2,24\%$  sedangkan pada kombinasi ekstender glukosa dengan krioprotektan DMSO (GD) atau metanol (GM), tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma *pra-freezing* tertinggi pada GD05% yaitu  $96,56 \pm 2,43\%$  dan terendah pada GM10% yaitu  $9,84 \pm 2,29\%$ . Tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma *pasca-thawing* bervariasi bergantung pada kombinasi ekstender dengan krioprotektan yang digunakan. Pada bahan ekstender ringer (RD atau RM), tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma *pasca-thawing* tertinggi pada RD15% yaitu  $54,98 \pm 28,61\%$  dan terendah pada RM10% yaitu  $7,51 \pm 4,32\%$  sedangkan pada ekstender glukosa (GD dan GM) tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma *pasca-thawing* tertinggi pada GM15% yaitu  $43,64 \pm 25,10\%$  dan terendah pada GD15% yaitu  $6,54 \pm 3,32\%$  (Gambar 2).

Kombinasi ekstender ringer dengan krioprotektan yang berbeda mampu mempertahankan tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma *pra-freezing* sedangkan pada ekstender glukosa tingkat penetasan telur semakin menurun dengan adanya peningkatan konsentrasi krioprotektan. Penurunan tingkat penetasan telur yang dibuahi sperma *pra-freezing* pada kombinasi ekstender dengan metanol (RM atau GM) diduga akibat adanya daya racun metanol yang dapat menurunkan viabilitas sperma. Proses fertilisasi pada penelitian ini baru dapat dilakukan sekitar 40 menit setelah pencampuran ekstender dengan krioprotektan meskipun proses ekuilibrasi untuk kriopreservasi dapat dilakukan selama 20 menit. Penambahan waktu tersebut memungkinkan terjadinya efek

racun metanol yang masuk ke dalam sel sperma. Daya racun metanol terhadap sel sperma dapat dihindari dengan tidak melakukan proses equilibrasi pada proses kriopreservasi yang menggunakan krioprotektan tersebut (Horvath, *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini, ekstender ringer dapat menghasilkan motilitas sperma pasca-

*thawing* dan tingkat penetasan telur yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstender glukosa. Babiak, *et al.* (1997) melaporkan ekstender Kurokura, berbasis dasar ion-ion garam, lebih layak digunakan pada kriopreservasi sperma ikan mas dibandingkan dengan ekstender glukosa. Namun berbeda dengan Horvath, *et al.* (2003) dan Urbanyi, *et al.* (2006) yang melaporkan motilitas pasca-



Gambar 2. Tingkat penetasan telur ikan nilam yang dibuahi sperma *pra-freezing* (mot-pre) dan pasca-*thawing* (mot-post) pada (a) kombinasi ringer dengan DMSO atau metanol dan (B) kombinasi glukosa dengan DMSO atau metanol. KR: Kontrol Ringer; RD: Kombinasi Ringer+DMSO; RM: Kombinasi Ringer+Metanol; KG: Kontrol Glukosa; GD: Kombinasi Glukosa+DMSO; GM: Kombinasi Glukosa+Metanol; 5, 10 dan 15: Konsentrasi krioprotektan yang digunakan (dalam %). Huruf yang berbeda pada masing-masing grafik menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ )

*thawing* yang lebih tinggi diperoleh pada ekstender glukosa dibandingkan dengan KCl atau larutan Kurokura modifikasi. Meskipun demikian, motilitas pasca-*thawing* pada masing-masing kombinasi ekstender glukosa pada penelitian ini menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata sehingga peluang penggunaan ekstender ini dengan tingkat molaritas yang berbeda masih dimungkinkan. Modifikasi ringer dengan penambahan glukosa 0,1% menunjukkan hasil kriopreservasi yang terbaik pada ikan *Tor khudree* (Basavarajaa & Hegde, 2004). Pada penelitian ini juga, kombinasi GM10% dapat menghasilkan tingkat penetasan telur yang tidak berbeda nyata dengan kombinasi pada RD. Pada penelitian lain, penggunaan ekstender madu, salah satu ekstender berbahan dasar gula, dapat menghasilkan tingkat penetasan telur yang tidak berbeda nyata dengan kontrol sperma segar (Sunarma, *et al.*, 2007).

Pada proses kriopreservasi, selain untuk meningkatkan volume cairan dan mempertahankan viabilitas sperma, ekstender juga harus mampu berfungsi sebagai pengontrol kondisi pH, penyedia sumber nutrisi dan mencegah terjadinya kerusakan membran plasma spermatozoa sehingga fungsionalitas dan kapabilitas sperma dapat dipertahankan (Tiersch, 2006). Perubahan pH dapat terjadi akibat adanya penurunan jumlah cairan dalam sel selama proses *freezing* sehingga bahan terlarut intraseluler dan ekstraseluler terkonsentrasi sehingga memungkinkan terjadinya pengendapan bahan tersebut dalam sel (Rana, 1995). Sementara itu, kerusakan membran plasma dapat terjadi ketika spermatozoa diekspos terhadap krioprotektan sebelum proses pembekuan yang mengakibatkan sperma kehilangan integritas dan fungsinya selama proses pembekuan dan *thawing* (He & Wood, 2004).

Ekstender biasanya dibuat dengan menyerupai kandungan ion yang ada pada cairan plasma sehingga cenderung bersifat spesies-spesifik (Alavi & Cosson,

2006) dan atau dibuat dengan menyerupai kondisi tekanan osmotik yang ditemukan pada cairan seminal sehingga mencegah terjadinya aktivasi sperma (Billard & Zhang, 2001). Bahan dasar ekstender dapat berupa ion-ion garam (Lahnsteiner, *et al.*, 2000) atau berbahan gula (Horvath, *et al.*, 2007) atau kombinasi keduanya (Basavaraja & Hegde, 2004). Pada penelitian ini, ekstender berbahan garam, larutan ringer, dan berbahan gula, larutan glukosa, mampu menjaga fungsionalitas sperma baik sebelum ataupun sesudah pencampuran dengan krioprotektan.

Krioprotektan digunakan pada proses kriopreservasi berfungsi untuk melindungi sel spermatozoa dari kerusakan baik akibat proses *freezing* maupun *thawing* dengan melakukan penetrasi ke dalam sel dan menarik cairan ke luar sel. Meskipun mekanisme penetrasi krioprotektan ke dalam sel spermatozoa belum sepenuhnya diketahui, beberapa krioprotektan dipercaya mampu membantu mengurangi kerusakan akibat pembentukan kristal es di dalam sel spermatozoa dan mencegah terjadinya kerusakan akibat dehidrasi ketika air meninggalkan sel untuk menjadi es pada larutan di luar sel (Tiersch, 2006). Meskipun demikian, penetrasi krioprotektan dalam sel dapat juga mengakibatkan kerusakan pada struktur sel akibat daya racun krioprotektan itu sendiri. Beragam krioprotektan dapat menyebabkan kerusakan material genetik sel walaupun mekanismenya belum diketahui (Kopeika, *et al.*, 2003). Kajian mengenai toksisitas krioprotektan menunjukkan DMSO atau metanol tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan awal embrio sedangkan peningkatan konsentrasi kedua bahan tersebut di atas 1,2 M dapat menurunkan tingkat kelangsungan hidup embrio (Kopeika, *et al.*, 2003). Secara ultrastruktur pada kriopreservasi spermatozoa ikan striped bass menunjukkan bahwa membran plasma spermatozoa pasca-*thawing* terlindungi secara lebih baik dengan konsentrasi

DMSO yang lebih tinggi (He & Wood, 2004).

Hasil penelitian ini menunjukkan kombinasi ekstender ringer atau glukosa dengan DMSO atau metanol cukup layak untuk digunakan pada proses kriopreservasi sperma ikan nilem. Modifikasi ekstender dan perbaikan prosedur kriopreservasi lebih lanjut masih diperlukan untuk mendapatkan tingkat penetasan telur yang lebih baik sehingga dapat diaplikasikan pada skala massal ataupun pada sperma ikan Cyprinid lainnya.

### Kesimpulan dan Saran

Kriopreservasi sperma ikan nilem cukup efektif dengan menggunakan kombinasi ekstender ringer atau glukosa dengan krioprotektan DMSO atau metanol dan dapat menghasilkan beragam motilitas spermatozoa dan penetasan telur yang dibuahi spermatozoa pasca-*thawing*. Persentase motilitas spermatozoa pasca-*thawing* tertinggi dihasilkan pada kombinasi ekstender ringer dan DMSO 10% sedangkan tingkat penetasan telur yang dibuahi spermatozoa pasca-*thawing* tertinggi dihasilkan pada kombinasi ringer dan DMSO 15%. Hasil penelitian ini menunjukkan kriopreservasi sperma ikan menggunakan kombinasi ekstender ringer dengan krioprotektan DMSO dapat dikembangkan lebih lanjut untuk diterapkan pada ikan Cyprinidae lainnya.

### Daftar Pustaka

- Alavi, S.M.H. and J. Cosson. 2006. Sperm Motility in Fishes (II). Effects of Ions and Osmolality: A Review. *Cell Biol. Int.*, 30:1-14.
- Babiak, I., J. Glogowski, E. Brzuska, J. Szumiec and J. Adamek. 1997. Cryopreservation of Sperm of Common Carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquac. Res.*, 28:567-571.
- Basavaraja, N., and S.N. Hegde. 2004. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. *Cryobiology*, 49:149-156.
- Billard, R. and T. Zhang. 2001. Techniques of Genetic Resource Banking in Fish. In P.F. Watson and W.V. Holt (eds.). *Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future*. Taylor and Francis, London. p. 156-170.
- Chao, N-H. and I.C. Liao. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197:161-189.
- 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.
- 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. Cryo preservation of Common Carp Sperm. *Aquat. Living Resour.* 16:457-460.
- Horvath, A., E. Miskolczi, S. Mihalffy, 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*, 54:251-257.
- Kopeika, J., E. Kopeika, T. Zhang, and D.M. Rawson. 2003. Studies on the Toxicity of Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol, Methanol and Glycerol to Loach (*Misgurnus fossilis*) Sperm and the Effect on Subsequent Embryo Development. *CryoLetters*, 24:365-374.

- Lahnsteiner, F., B. Berger, A. Horvath, B. Urbanyi and T. Weismann. 2000. Cryopreservation of Spermatozoa in Cyprinid Fishes. *Theriogenology*, 54:1477-1498.
- Linhart, O., M. Rodina and J. Cosson. 2000. Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. *Cryobiology*, 41:241-250.
- Lubzens, E., N. Daube, I. Pekarsky, Y. Magnus, A. Cohen, F. Yusefovich and P. Feigin. 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) Spermatozoa Cryobanks – Strategies in Research and Application. *Aquaculture*, 155:13-30.
- Muchlisin, Z.A., R. Hashim and A.S.C. Chong. 2004. Preliminary Study on the Cryopreservation of Tropical Bagrid Catfish (*Mystus nemurus*) Spermatozoa; the Effect of Extender and Cryoprotectant on the Motility after Short-Term Storage. *Theriogenology*, 62:25–34.
- Rana, K. 1995. Preservation of Gametes. In N.L. Bromage and R.R. Roberts (eds.). *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science. London. p. 53-75.
- Routray, P., A.K. Choudhary, S.N. Dash, D.K. Verma, C. Dash, P. Swain, J.K. Jena, S.D. Gupta and N. Sarangi. 2006. Cryopreservation of Dead Fish Spermatozoa Several Hours after Death of Indian Major Carp, *Labeo rohita* and its Successful Utilization in Fish Production. *Aquaculture*, 261:1204-1211.
- Sunarma, A., D.W.B. Hastuti, dan Y. Sistina. 2007. Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842). Prosiding “Aquaculture Indonesia 2007”. Masyarakat Akuakultur Indonesia. Surabaya 05-07 Juni 2007. 9p.
- Suquet, M., C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson and R. Billard. 2000. Cryopreservation of Sperm in Marine Fish. *Aquac. Res.*, 31:231-243.
- Tiersch, T.R. 2006. Fish Sperm Cryopreservation for Genetic Improvement and Conservation in Southeast Asia. *Fish for the People*, 4(2):21-33.
- Urbanyi, B., T. Szabo, E. Miskolczi, S. Mihalfy, K. Vranovics, and A. Horvath. 2006. Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. *J. Appl. Ichthyol.*, 22:201–204.
- Warnecke, D. and H. Pluta. 2003. Motility and Fertilizing Capacity of Frozen/Thawed Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Sperm using Dimethyl-Acetamide as the Main Cryoprotectant. *Aquaculture*, 215:167-185.