

Madu Sebagai Agen Antioksidan Pada Spermatozoa Ikan Dewa (Tor Soro) Pascapreservasi 48 Jam = Honey as Antioxidant Agent on Spermatozoa of Dewa Fish (Tor soro) 48 Hours Post-Preservation

Suci Lestari, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920519178&lokasi=lokal>

Abstrak

Protektan merupakan faktor penting yang diperlukan untuk melindungi senyawa sel dalam preservasi sperma. Tingkat toksisitas protektan dipengaruhi oleh jenis, konsentrasi, suhu, dan lama pemaparan senyawa tersebut. Madu mengandung gula sederhana (monosakarida) seperti fruktosa, glukosa, dan antioksidan yang menjaga motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa dalam proses preservasi. Efektivitas madu sebagai antioksidan dalam preservasi sperma berbeda-beda antar spesies karena adanya perbedaan karakteristik biofisik antar jenis sel sehingga diperlukan optimalisasi protokol preservasi sperma pada ikan Mahseer (Tor soro). Tor soro dikenal sebagai ikan yang memiliki nilai ekonomis tinggi, namun populasinya sudah jarang ditemui di alam karena adanya penangkapan berlebih, serta adanya kerusakan habitat spesies tersebut. Walaupun kemampuan madu sebagai agen antioksidan untuk mengawetkan sperma T. soro telah dibuktikan melalui analisis kelainan sperma, viabilitas, motilitas dan fertilitas. Namun, daya tetas telur, ultrastruktur sperma, dan ekspresi gen HSP70 dan HSP90 setelah preservasi jarang dilaporkan. Protein heat shock dikenal sebagai molekul pendamping dalam membantu dan memperbaiki pembentukan protein saat sel mengalami tekanan, seperti adanya penurunan suhu sampai 4 oC. Tujuan penelitian ini antara lain untuk: (1) mengevaluasi fungsi fisiologis spermatozoa pascapreservasi berdasarkan persentase viabilitas, motilitas sperma dan daya tetas telur; (2) mengidentifikasi perubahan morfologi berdasarkan pengamatan ultrastruktur spermatozoa menggunakan mikroskop elektron transmisi dengan perbesaran 1500 kali. Parameter yang diamati adalah panjang, lebar, dan luas kepala spermatozoa; dan (3) mengevaluasi pengaruh penambahan madu pada penyimpanan 4 oC terhadap ekspresi gen HSP70 dan HSP90 pada spermatozoa T. soro pascapreservasi. Semen T. soro diperoleh dengan teknik stripping. Kemudian diencerkan menggunakan larutan fish ringer dan madu dengan perbandingan 1:10. Konsentrasi madu yang digunakan adalah 0%, 0,5%, 1%, 1,5% dan 2%. Selanjutnya semen disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C selama 48 jam, dan diamkan pada suhu ruang selama 35 detik. Data ultrastruktur sperma dianalisis menggunakan ImageJ. Ekspresi gen HSP70 dan HSP90 menggunakan qPCR. Persentase viabilitas, motilitas, daya tetas, ultrastruktur, dan data molekuler dianalisis menggunakan ANOVA dan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan madu sebagai antioksidan terhadap semen pascapreservasi terhadap persentase viabilitas, motilitas spermatozoa, dan daya tetas telur ($p < 0,05$). Persentase viabilitas, motilitas spermatozoa dan daya tetas telur tertinggi terdapat pada konsentrasi 1% pascapreservasi dengan jumlah rata-rata $44,64 \pm 3,32\%$; $55,12 \pm 6,01\%$; dan $16,33 \pm 1,35\%$ ($p < 0,05$). Data ultrastruktur menunjukkan bahwa konsentrasi optimum menunjukkan luas kepala spermatozoa tertinggi ($p < 0,05$) pada konsentrasi madu 1% dibandingkan dengan spermatozoa segar dan spermatozoa yang disimpan tanpa madu pada suhu dingin, masing-masing: $1,85 \pm 0,08 \mu\text{m}$ dan $2,88 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$. Sperma segar yang disimpan pada suhu dingin tanpa madu menunjukkan kerusakan membran yang drastis dibandingkan dengan sperma yang disimpan pada suhu dingin dengan pelindung madu. Analisis molekuler menunjukkan bahwa setelah proses amplifikasi terdapat perbedaan ekspresi gen HSP70 dan HSP90. Hasil analisis molekuler pada

ekspresi gen HSP70 dan HSP90 spermatozoa yaitu kelompok HSP70 tidak berbeda nyata terhadap variasi protektif madu sebagai agen anti oksidan, namun memiliki kecenderungan peningkatan ekspresi setelah preservasi. Ekspresi gen relatif HSP90 memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan pada 1% ($29,41 \pm 0,70$) terhadap 0% ($31,50 \pm 0,32$); 1,5% ($33,27 \pm 0,46$); dan 2% ($36,93 \pm 3,42$) $p < 0,05$ dan cenderung meningkat dibandingkan sperma segar dan kelompok tanpa madu. Kebaruan penelitian ini adalah mempelajari pengaruh madu sebagai pelindung alami dalam menyimpan spermatozoa T. soro pada suhu dingin (4 oC) selama 48 jam berdasarkan persentase karakteristik ultrastruktural (lebar, panjang, dan luas kepala). Keberhasilan penelitian ini juga dapat dijadikan pedoman (protokol) penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin (4 oC) yang dapat diterapkan oleh pembudidaya ikan (budidaya) dan dapat digunakan untuk keberhasilan manajemen reproduksi serta acuan untuk perbaikan protokol kriopreservasi T. soro.

.....Protectant is an important factor needed to protect cell compounds in cold storage in sperm preservation. Its proper use is based on toxicity which is influenced by the type, concentration, temperature, and duration of exposure to the compound. Honey contains simple sugars (monosaccharides) such as fructose, glucose, and antioxidants which maintain the motility, viability, and integrity of the spermatozoa membrane in the preservation process. The use of honey as an antioxidant in sperm preservation varies between species due to differences in biophysical characteristics between cell types, so it is necessary to optimize the sperm preservation protocol in Mahseer fish (Tor soro). In addition, the role of heat shock protein in reproduction is widely recognized as a companion molecule in assisting and repairing protein formation when stress occurs. Although the ability of honey as an antioxidant agent to preserve T. soro sperm has been proven through analysis of sperm abnormalities, viability, motility and fertility, egg hatchability, sperm ultrastructure, and HSP70 and HSP90 gene expression after preservation is rarely reported. The purpose of this study was to evaluate the function of spermatozoa after being preserved by observing the ultrastructural observations of spermatozoa using a transmission electron microscope with a magnification of 1500 times. The parameters observed were the length, width, and head area of the spermatozoa. Next, evaluate the effect of adding honey in cold storage on HSP70 and HSP90 gene expression in preserved T. soro spermatozoa. This study aims to evaluate the best concentration of honey as an antioxidant, using sperm obtained from Tor soro fish by stripping technique. Then it is diluted with a solution of Ringer's fish and honey in a ratio of 1:10. The concentration of honey used was 0%, 0.5%, 1%, 1.5% and 2%. Furthermore, the sperm was stored in the refrigerator at 4°C for 48 hours, and thawed at room temperature for 35 seconds. The physiological analysis included egg viability, motility, and hatchability. Morphological analysis based on ultrastructural data and molecular analysis based on HSP70 and HSP90 gene expression. Viability, motility, and hatchability percentages were analyzed using ANOVA and Tukey's test. Sperm ultrastructure data were analyzed using ImageJ. Next, sperm RNA was extracted and converted into cDNA prior to the qPCR process. The results showed that there was a significant effect of honey as an antioxidant on sperm after preservation on the percentage of sperm viability, motility, and hatchability ($p < 0.05$). The highest percentage of viability, sperm motility, and egg hatchability were at 1% post-preservation concentration with a total of 44.64 ± 3.32 , 55.12 ± 6.01 , and $16.33 \pm 1.35\%$ ($p < 0.05$). Ultrastructural data showed that the optimum concentration showed the highest spermatozoa head area ($p < 0.05$) at 1% honey concentration compared to fresh spermatozoa and spermatozoa stored without honey at cold temperatures, respectively: $1.85 \pm 0.08\ \mu\text{m}$ and $2.88 \pm 0.07\ \mu\text{m}^2$. Fresh sperm stored at cold temperatures without honey showed drastic membrane damage compared to sperm stored at cold temperatures with protective honey. Molecular analysis showed that after the amplification process there were differences in the expression of the HSP70

and HSP90 genes. The results showed that after the amplification process there were significant differences in the expression of the HSP70 and HSP90 genes at $p < 0.05$. The results showed that there was no significant difference for the HSP70 group to the protective variation of honey, but had a tendency to have a strong increase in expression on storage 4 °C. The relative gene expression of HSP90 have a significant average difference at 1% (29.41 ± 0.70) to 0% (31.50 ± 0.32); 1.5% (33.27 ± 0.46); and 2% (36.93 ± 3.42) $p < 0.05$ and tend to be weak in the level of expression. The novelty of this research was to study the effect of honey as a natural protector in storing *T. soro* spermatozoa at cold temperatures (4 °C) for 48 hours based on the percentage of ultrastructural characteristics (width, length, and head area). The success of this research can also be used as a guideline (protocol) for storing spermatozoa at non-freezing temperatures that can be applied by fish farmers (cultivation) and can be used for successful reproductive management as well as a reference for improving cryopreservation protocols in *T. soro*.