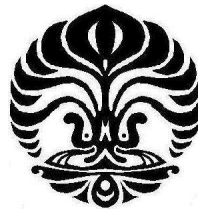


**PENGARUH PEMBERIAN BERBAGAI KONSENTRASI SUSU
SKIM TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA IKAN GURAMI
(*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) DUA HARI
PASCAKRIOPRESERVASI**

SKRIPSI

**ISTA ANINDITA
0606069905**



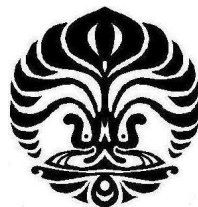
**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2010**

**PENGARUH PEMBERIAN BERBAGAI KONSENTRASI SUSU
SKIM TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA IKAN
GURAMI (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) DUA HARI
PASCAKRIOPRESERVASI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains**

**ISTA ANINDITA
0606069905**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Ista Anindita

NPM : 0606069905

Tanda Tangan :

Tanggal : 28 Juni 2010



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Ista Anindita
NPM : 0606069905
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Susu Skim terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Gurami (*Osfhronemus goramy*, Lacepede 1801) Dua Hari Pascakriopreservasi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Dr. Abinawanto ()
Pembimbing 2 : Retno Lestari, M.Si. ()
Penguji : Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed. ()
Penguji : Drs. Wisnu Wardhana, M.Si. ()
Penguji : Dr. Dadang Kusmana ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 28 Juni 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat, karunia, dan kehendak-Nya, penelitian dan penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan. Sholawat dan salam penulis sampaikan kepada Rasulullah SAW, sang rahmat bagi seluruh alam.

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Dr. Abinawanto selaku Pembimbing I dan Retno Lestari, M.Si. selaku Pembimbing II atas segala upaya, bimbingan, perhatian, dukungan, kesabaran, rasa kekeluargaan, dan doa yang diberikan kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan skripsi.

Penulis juga mengucapkan terima kasih banyak kepada Dra. Noverita D. Takarina, M.Sc. selaku Penasihat Akademik atas rasa sayang, perhatian, dan arahnya sehingga penulis mampu menjalankan perkuliahan dengan baik. Terima kasih kepada Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M.Biomed., Drs. Wisnu Wardhana, M.Si., dan Dr. Dadang Kusmana selaku Penguji yang telah memberikan banyak saran yang membangun untuk skripsi ini.

Terima kasih kepada Dr.rer.nat. Mufti P.Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI beserta seluruh staf pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Drs. Ellyzar I.M. Adil, M.Si. (Alm.) selaku staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI dan seorang motivator bagi penulis untuk terus berjuang. Terima kasih kepada Ade Sunarma, M.Si. dari BBPBAT, Pak Taryana, Mbak Asri, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas segala bantuan yang telah diberikan.

Terima kasih yang tak terhingga untuk *my special* Tanyachan yang terdiri atas Nisa Fitrianingrum (Nyonya), Khairani Nurman (Ranchan), dan Intan Ayu Pratiwi (Tane) atas dukungan, bantuan, kebersamaan dalam suka dan duka, dan segala momen berharga yang tak akan terganti. Terima kasih juga kepada Tim Tawes 05 (Ka Edah, Ka Susan, Ka Dila, Ka Sofie, Ka Leny, dan Ka Cha2) dan Ka Mariana atas segala bantuannya untuk penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi. Terima kasih untuk Rara dan Yen Yen dalam Tim Gurami, dan Tim

Pakan (Ka Asmi, Eko Be, dan Arief) atas bantuan, kebersamaan dan dukungannya. Terima kasih tidak lupa penulis ucapkan kepada Ka Yudha (Banced) atas saran dan masukannya mengenai program SPSS yang membantu penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi.

Special thanks for UKOR FMIPA UI terutama cabang futsal yang telah memberikan kesibukan, pengalaman berorganisasi, dan kesempatan untuk mengenal banyak teman. *Another special thanks for* atlet-atlet futsal FMIPA UI antara lain Ka Muth, Wulan, Eghie, Yuanita, Chir, Agung, Ka Hamzah, dan Agus atas ilmu yang telah dibagi kepada penulis, segala kebersamaan dalam suka dan duka, bantuan, dukungan, persaudaraan, perhatian, dan kesediaannya untuk penulis ketika penulis membutuhkan penyemangat. Terima kasih kepada Nia, Sholia, Henjo, dan seluruh keluarga besar Biologi Angkatan 2006 (Felix) yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu. Terima kasih juga kepada Fauzi Rakhman atas dukungan, rasa sayang, dan bantuannya untuk penulis.

Teruntuk mama dan papa tersayang, terima kasih atas segala doa, dukungan, kasih sayang, semangat, perhatian, dan segalanya yang telah diberikan kepada penulis. Penulis berjanji akan selalu menjadi seorang anak yang membanggakan mama dan papa. Terima kasih kepada adik-adik penulis, Listia dan Lutfan yang tercinta dan seluruh keluarga besar penulis atas doa dan kasih sayang tak terhingga yang telah dicurahkan.

Akhir kata, penulis memohon maaf apabila ada hal yang kurang berkenan. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu dan orang yang membacanya.

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ista Anindita
NPM : 0606069905
Program Studi : S1 Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Susu Skim terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) Dua Hari Pascakriopreservasi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 28 Juni 2010

Yang menyatakan

(Ista Anindita)

ABSTRAK

Nama : Ista Anindita
Program Studi : S1 Biologi
Judul : Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Susu Skim terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) Dua Hari Pascakriopreservasi

Telah dilakukan penelitian mengenai kriopreservasi spermatozoa ikan gurami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) menggunakan berbagai konsentrasi susu skim dengan metanol 10%. Tujuan penelitian mengetahui konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, atau 25%) yang terbaik terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi. Hasil uji ANAVA satu faktor menunjukkan pemberian berbagai konsentrasi susu skim memiliki nilai rata-rata persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Konsentrasi susu skim yang terbaik adalah 15% karena menghasilkan nilai persentase rata-rata motilitas ($80,98 \pm 4,08\%$) dan viabilitas ($84 \pm 1,79\%$) tertinggi, serta nilai persentase rata-rata abnormalitas ($14 \pm 2,28\%$) terendah.

Kata kunci: kriopreservasi, susu skim, metanol, ikan gurami, spermatozoa, motilitas, viabilitas, abnormalitas.

ABSTRACT

Name : Ista Anindita
Study Program: S1 Biology
Title : The Effect of Skim Milk in Various Concentrations on Spermatozoa Quality of Gourami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) Two Days Postcryopreservation

The research was about cryopreservation of gourami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) spermatozoa using various concentrations of skim milk combined with 10% methanol. The aim of the research was to determine the best concentration of skim milk (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, or 25%) on spermatozoa motility, viability, and abnormality of gourami two days postcryopreservation. The one factor ANOVA showed that various concentrations of skim milk had a significant different ($P < 0,05$) average value of motility, viability, and abnormality on spermatozoa of gourami two days postcryopreservation. Skim milk 15% is the best concentration, because it produced the highest average value of percentage in motility ($80,98 \pm 4,08\%$) and viability ($84 \pm 1,79\%$) and the lowest average value of percentage in abnormality ($14 \pm 2,28\%$).

Keywords: cryopreservation, skim milk, methanol, gourami, spermatozoa motility, viability, abnormality.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Ikan Gurami (<i>Osphronemus goramy</i> , Lacepede, 1801)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Penyebaran	6
2.1.2 Morfologi	7
2.2 Spermatozoa Ikan	7
2.3 Pengukuran Kualitas Spermatozoa Ikan	9
2.4 Kriopreservasi	10
2.4.1 Definisi	10
2.4.2 Faktor-faktor yang Memengaruhi Kriopreservasi	11
2.4.2.1 Metode Pengoleksian Semen	11
2.4.2.2 Bentuk Kemasan	12
2.4.2.3 Krioprotektan	12
2.4.2.4 Ekstender	13
2.4.2.5 Rasio Pengenceran Semen dengan Pengencer	13
2.4.2.6 Ekuilibrasi	13
2.4.2.7 Laju Pembekuan	14
2.4.2.8 Pencairan (<i>Thawing</i>)	14
2.5 Metanol	14
2.6 Susu Skim	15
3. BAHAN DAN CARA KERJA	17
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	17
3.2 Bahan	17
3.2.1 Spermatozoa	17
3.2.2 Pakan Ikan Gurami	18
3.2.3 Bahan Kimia	18
3.2.4 Bahan Habis Pakai	19
3.3 Alat	19
3.4 Cara Kerja	19
3.4.1 Perlakuan pada Penelitian	19
3.4.2 Pemeliharaan Ikan Gurami	20
3.4.3 Pembuatan Larutan Aktivator	20

3.4.4 Pembuatan Ekstender <i>Fish Ringer</i>	20
3.4.5 Pembuatan Larutan Pengencer	21
3.4.6 Pembuatan Larutan Eosin-Y 0,5%	22
3.4.7 Pembuatan Larutan 0,15 M Dapar Fosfat pH 6,8	22
3.4.8 Pembuatan Larutan Giemsa	22
3.4.9 Induksi Hormon	22
3.4.10 Pengambilan Sampel Semen	23
3.4.11 Pengenceran	24
3.4.12 Ekuilibrasi	24
3.4.13 Pembekuan (<i>Freezing</i>)	24
3.4.14 Pencairan (<i>Thawing</i>)	24
3.4.15 Evaluasi Semen dan Analisis Spermatozoa	25
3.4.15.1 Evaluasi Semen	25
3.4.15.2 Analisis Spermatozoa	25
3.4.15.2.1 Pengamatan dan Penghitungan Persentase Motilitas Spermatozoa	25
3.4.15.2.2 Pengamatan dan Penghitungan Persentase Viabilitas Spermatozoa	27
3.4.15.2.3 Pengamatan dan Penghitungan Persentase Abnormalitas Spermatozoa	28
3.4.15.3 Analisis Data	30
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Pengamatan Semen Segar Ikan Gurami	31
4.1.1 Volume, pH, dan Warna Semen	31
4.1.2 Analisis Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami	35
4.1.2.1 Persentase Motilitas Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami	35
4.1.2.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami	38
4.1.2.3 Persentase Abnormalitas Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami	40
4.2 Pengamatan Spermatozoa Ikan Gurami Dua Hari Pascakriopreservasi	42
4.2.1 Persentase Motilitas Spermatozoa Ikan Gurami Dua Hari Pascakriopreservasi	42
4.2.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa Ikan Gurami Dua Hari Pascakriopreservasi	47
4.2.3 Persentase Abnormalitas Spermatozoa Ikan Gurami Dua Hari Pascakriopreservasi	52
5. KESIMPULAN DAN SARAN	58
5.1 Kesimpulan	58
5.2 Saran	58
DAFTAR ACUAN	59

DAFTAR GAMBAR

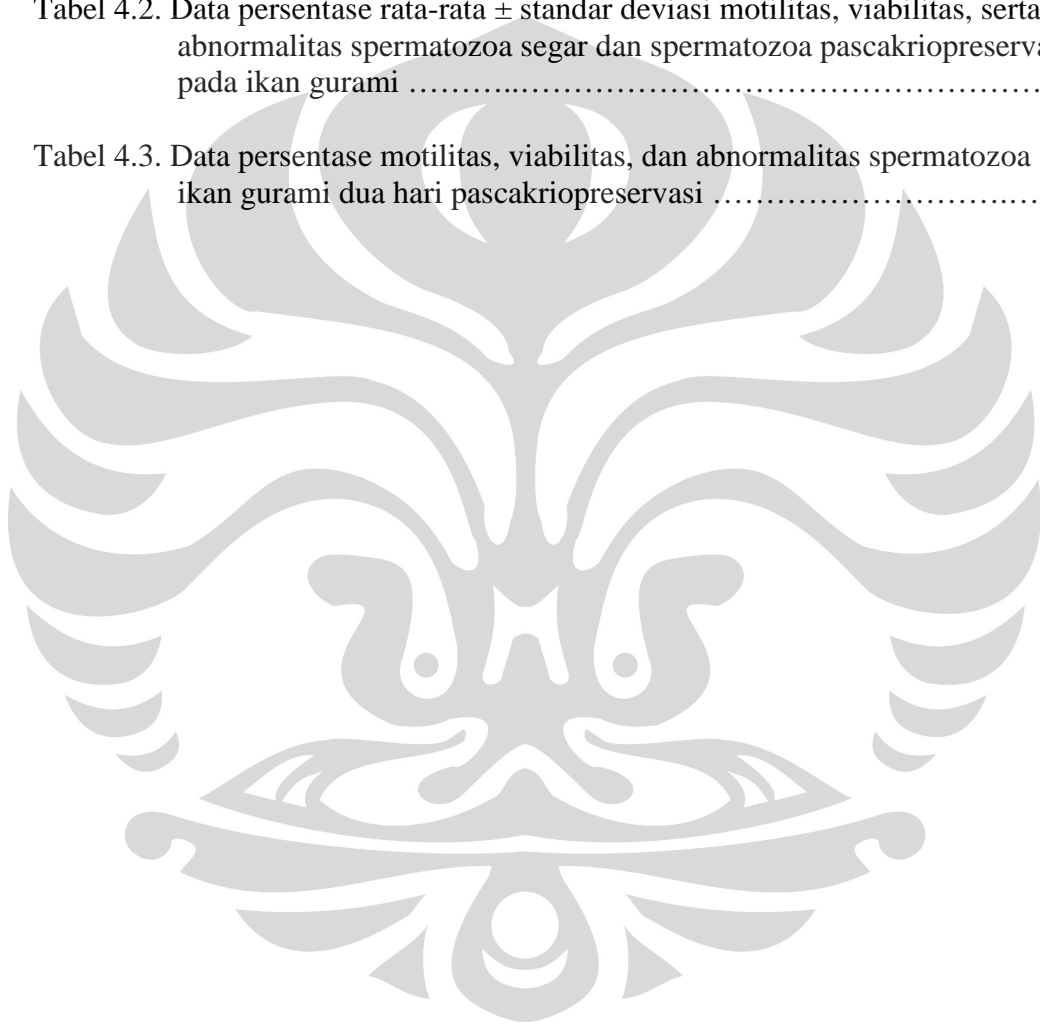
Gambar 2.1. Ikan gurami jantan (<i>Osphronemus goramy</i> , Lacepede 1801)	6
Gambar 2.2. Morfologi spermatozoa ikan dengan fertilisasi eksternal	8
Gambar 3.1. Tempat pemeliharaan ikan gurami	17
Gambar 3.2. Daun sente (<i>Alocasia macrorrhiza</i> , Schott)	18
Gambar 3.3. Metode pengoleksian semen dengan cara <i>stripping</i>	23
Gambar 3.4. Skema pengenceran semen	26
Gambar 3.5. Alat pengamatan mikroskopik spermatozoa	27
Gambar 3.6. Skema prosedur cara kerja penelitian	29
Gambar 4.1. Kontrol hormon reproduksi ikan jantan pada <i>cyste seminiferus</i>	32
Gambar 4.2. Kontrol hormon reproduksi terhadap pematangan spermatozoa dan spermiasi pada ikan jantan	33
Gambar 4.3. Mekanisme kerja hormon analog GnRH yang dikombinasikan dengan domperidon terhadap pematangan spermatozoa dan pengeluaran semen	34
Gambar 4.4. Skema inisiasi motilitas spermatozoa ikan	37
Gambar 4.5. Viabilitas spermatozoa ikan gurami	39
Gambar 4.6. Spermatozoa normal ikan gurami	41
Gambar 4.7. Diagram batang persentase rata-rata motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	44
Gambar 4.8. Struktur molekul metanol	45
Gambar 4.9. Diagram batang persentase rata-rata viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	48
Gambar 4.10. Mekanisme perlindungan membran sel oleh metanol dan kasein	50
Gambar 4.11. Diagram batang persentase rata-rata abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	53

Gambar 4.12. Spermatozoa abnormal ikan gurami 55



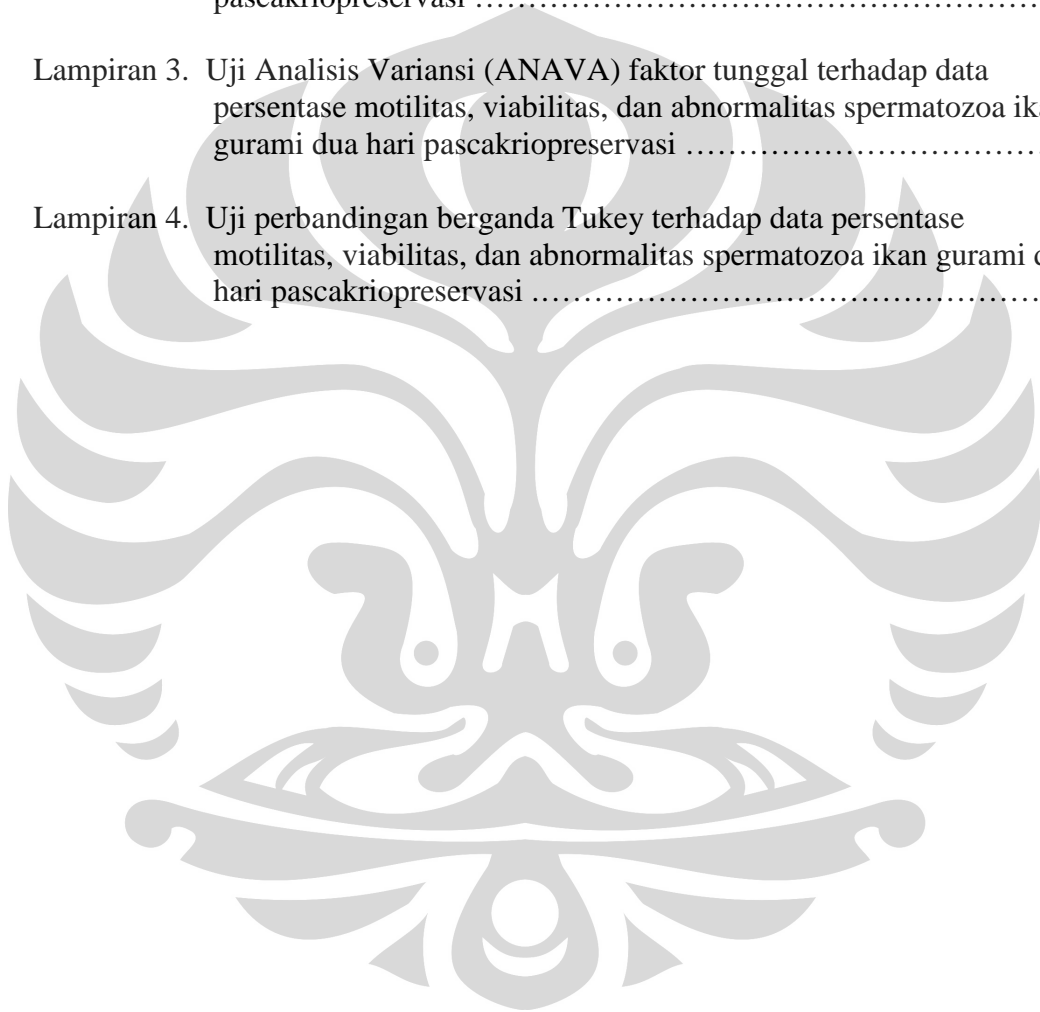
DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Komposisi ekstender <i>fish</i> Ringer yang digunakan dalam penelitian	21
Tabel 3.2. Pengenceran semen	21
Tabel 4.1. Data evaluasi semen dan analisis spermatozoa segar ikan gurami	42
Tabel 4.2. Data persentase rata-rata \pm standar deviasi motilitas, viabilitas, serta abnormalitas spermatozoa segar dan spermatozoa pascakriopreservasi pada ikan gurami	56
Tabel 4.3. Data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	69
Lampiran 2. Uji homogenitas Levene terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	71
Lampiran 3. Uji Analisis Variansi (ANOVA) faktor tunggal terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	74
Lampiran 4. Uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi	77



BAB I PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki potensi sumber daya ikan dan keanekaragaman hayati yang tinggi. Indonesia memiliki sekitar 3.000 jenis ikan air laut dan air tawar (DKP 2008: 1). Ikan air laut dan ikan air tawar tersebut telah banyak dibudidayakan di Indonesia. Salah satu jenis ikan air tawar yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah ikan gurami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801). Budidaya ikan gurami berpotensi tinggi untuk dikembangkan. Ikan gurami memiliki permintaan pasar di daerah Jakarta dan Jawa Barat sebesar dua belas ton perminggu. Permintaan pasar yang tinggi tersebut membuat usaha budidaya ikan gurami memberikan prospek bisnis menjanjikan karena harga jual ikan gurami yang relatif lebih tinggi dibandingkan ikan air tawar lain. Permintaan pasar tersebut tidak diimbangi dengan ketersediaan jumlah ikan gurami yang berkualitas. Ikan gurami yang berkualitas dapat diperoleh melalui benih ikan gurami yang berkualitas pula. Oleh karena itu, benih ikan gurami yang berkualitas sangat diperlukan dalam budidaya ikan gurami. Namun, ketersediaan jumlah benih ikan gurami yang berkualitas untuk dapat memenuhi permintaan pasar sampai saat ini belum terpenuhi (Sunarya 2007: 11).

Pemenuhan kebutuhan benih ikan gurami yang berkualitas masih menjadi kendala. Hal tersebut disebabkan budidaya ikan gurami masih menggunakan teknik konvensional. Budidaya ikan gurami secara konvensional dilakukan dengan menempatkan induk jantan dan induk betina dalam satu tempat pembiakan. Kelemahan teknik konvensional pada pembudidayaan ikan gurami yaitu dapat terjadi *inbreeding* pada ikan gurami yang dibudidayakan. *Inbreeding* dapat menurunkan mutu benih ikan gurami seperti pertumbuhan yang lambat, tingkat kematian yang tinggi, dan rentan terhadap penyakit (Praseno *dkk.* 1993: 268). Hal tersebut menghambat pembiakan ikan gurami. Ikan gurami jantan harus mampu membuahi ikan gurami betina setiap saat agar dapat menghasilkan benih ikan gurami yang berkualitas untuk dapat memenuhi permintaan pasar. Oleh sebab itu, diperlukan suatu teknik alternatif yang dapat memenuhi

ketersediaan benih ikan gurami yang berkualitas. Salah satu teknik yang dapat dilakukan adalah kriopreservasi.

Kriopreservasi adalah teknik penyimpanan materi genetik dalam keadaan beku (suhu di bawah 0° C) (ERFP 2004: 9). Materi genetik yang dapat dikriopreservasi antara lain *blastoderm*, embrio, ovum, dan spermatozoa. Kriopreservasi spermatozoa lebih banyak dilakukan dibandingkan kriopreservasi materi genetik lainnya (Tambing 2005: 1). Spermatozoa memiliki daya tahan hidup yang tinggi. Ukuran serta struktur spermatozoa juga lebih sederhana dibandingkan materi genetik lainnya, sehingga prosedur kerja dalam kriopreservasi spermatozoa lebih sederhana (Kuo-chun Liu *dkk.* 1993: 63--64).

Spermatozoa ikan gurami yang digunakan dalam penelitian diperoleh setelah dilakukan pengkoleksian semen ikan gurami. Pengkoleksian semen ikan gurami dilakukan dengan metode pengurutan (*stripping*). Pengurutan (*stripping*) dilakukan pada bagian perut (abdomen) ke arah urogenital hingga semen keluar. Kelebihan metoda pengurutan (*stripping*) adalah tidak melukai ikan gurami. Pengkoleksian semen juga dapat dilakukan dengan metode pembedahan. Namun, metode tersebut memiliki kelemahan yaitu harus mengorbankan ikan untuk memperoleh semen ikan gurami (Harvey 1983: 315; Melo & Godinho 2006: 381). Semen yang telah berhasil dikoleksi, kemudian digunakan dalam proses kriopreservasi.

Keberhasilan teknik kriopreservasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain metode pengkoleksian semen, bentuk kemasan, krioprotektan, ekstender, perbandingan semen dan pengencer, ekuilibrasi, laju pembekuan, dan pencairan. Pengencer terdiri atas krioprotektan dan ekstender. Kombinasi krioprotektan dan ekstender yang tepat mampu meningkatkan keberhasilan teknik kriopreservasi (Tambing 2005: 2).

Krioprotektan adalah senyawa yang mampu mencegah pembentukan kristal es pada proses kriopreservasi (Boediono 2007: 7). Kristal es terjadi akibat perubahan suhu pada proses pembekuan. Kristal es dapat menyebabkan kerusakan membran sel. Kerusakan membran sel tersebut dapat mengakibatkan kematian sel. Oleh karena itu, krioprotektan dapat meminimalkan kerusakan sel pada proses kriopreservasi (Muchlisin & Azizah 2009: 166).

Krioprotektan terdiri atas krioprotektan ekstraseluler dan krioprotektan intraseluler (Hovarth & Urbanyi 2000: 317). Contoh krioprotektan ekstraseluler adalah protein yang berupa kuning telur atau susu skim, serta gula (Muchlisin 2005: 12). Krioprotektan intraseluler yang biasa digunakan dalam kriopreservasi spermatozoa adalah gliserol, dimetil sulfoksida (DMSO), dimetil asetat (DMA), dan metanol (Hovarth & Urbanyi 2000: 317).

Krioprotektan ekstraseluler yang digunakan dalam penelitian adalah susu skim. Susu skim adalah susu dengan kandungan lemak 0--1% (Oberweis 2001: 2). Susu skim digunakan dalam penelitian karena susu skim dapat melindungi sel spermatozoa dari *cold shock* selama pembekuan. Komponen dalam susu yang berperan sebagai pelindung spermatozoa dari *cold shock* adalah protein kasein (Toelihere 1981: 121; Salisbury & VanDemark 1985: 588). Protein kasein pada susu skim merupakan protein konjugat yang mudah berikatan dengan senyawa lain (Goff 1995a: 7). Protein tersebut mampu berikatan dengan molekul-molekul spesifik pada membran spermatozoa dan membentuk lapisan perlindungan spermatozoa (*membrane coating*) (Lahnsteiner *dkk.* 2004: 807). Sebelum digunakan dalam kriopreservasi, susu skim dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 87--97° C selama satu menit. Pemanasan bertujuan mengurangi atau menghilangkan efek racun yang disebabkan oleh laktenin yang terkandung dalam susu (Salisbury & VanDemark 1985: 588--589). Susu skim sebagai krioprotektan ekstraseluler dapat dikombinasikan dengan berbagai krioprotektan intraseluler, seperti metanol (Harvey 1983: 315).

Krioprotektan intraseluler yang digunakan dalam penelitian adalah metanol. Metanol merupakan bentuk alkohol yang paling sederhana. Metanol tergolong krioprotektan intraseluler karena dapat berdifusi masuk ke dalam sel melalui membran sel (McGuigan 2003: 3). Metanol juga memiliki sifat toksik yang lebih rendah jika dibandingkan dengan krioprotektan intraseluler lain seperti DMSO dan DMA (Harvey *dkk.* 1982: 1869). Penelitian mengenai kriopreservasi dengan krioprotektan metanol telah banyak dilakukan, antara lain penelitian Shuyang He dan Woods (2003: 258) pada spermatozoa ikan *stripped bass* (*Morone saxatilis*), Horvarth *dkk.* (2003: 458) pada spermatozoa ikan mas, dan Jodun *dkk.* (2006: 37) pada spermatozoa ikan *atlantic salmon* (*Salmo salar*).

Krioprotektan intraseluler dan krioprotektan ekstraseluler akan berinteraksi dan saling melengkapi dalam menjalankan mekanisme perlindungan sel (Suquet *dkk.* 2000: 237). Penggunaan susu skim sebagai krioprotektan ekstraseluler dengan metanol sebagai krioprotektan intraseluler dapat mempertahankan kualitas spermatozoa yang dikriopreservasi. Zuraida (2009: 55) melakukan kriopreservasi spermatozoa ikan tawes menggunakan kombinasi susu skim dan metanol sebagai krioprotektan dengan hasil motilitas tertinggi sebesar 83,23% satu hari pascakriopreservasi. Susu skim 15% dan metanol 5% telah berhasil digunakan pada kriopreservasi spermatozoa ikan tilapia dan menghasilkan nilai rata-rata persentase motilitas dengan kisaran 40--80% (Nai-Hsien Chao *dkk.* 1987: 115) serta pada kriopreservasi spermatozoa ikan *Sarotherodon mossambicus* menghasilkan hasil motilitas sebesar $\pm 70\%$ satu hingga sepuluh hari pascakriopreservasi (Harvey 1983: 315).

Lamanya kriopreservasi berkisar antara satuan jam hingga tahunan (Suquet *dkk.* 2000: 232). Lamanya kriopreservasi pada penelitian Hovarth *dkk.* (2003: 458) adalah 3 jam pada spermatozoa ikan mas, Jodun *dkk.* (2006: 37) selama 2 hari pada spermatozoa ikan salmon, Christensen & Tiersch (2005: 2104) selama 1 hari pada spermatozoa ikan *channel catfish (Ictalurus punctatus)*, dan Muchlisin *dkk.* (2004: 28) selama 15 hari pada spermatozoa ikan *tropical bagrid catfish (Mystus nemurus)*. Periode kriopreservasi pada penelitian dilakukan selama dua hari. Hal tersebut untuk optimasi teknik kriopreservasi dan untuk mengetahui kualitas spermatozoa jika waktu kriopreservasi diperpanjang dari prapenelitian yaitu kriopreservasi selama satu hari.

Sampai saat ini, penelitian mengenai kriopreservasi spermatozoa ikan gurami dengan menggunakan susu skim sebagai krioprotektan ekstraseluler belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi susu skim yang terbaik dalam kriopreservasi spermatozoa ikan gurami. Hasil penelitian diharapkan dapat diperoleh konsentrasi susu skim yang terbaik untuk kriopreservasi spermatozoa ikan gurami, sehingga penelitian dapat diaplikasikan dalam pembudidayaan ikan gurami. Penelitian diharapkan bermanfaat dalam industri akuakultur untuk penyediaan benih ikan gurami yang berkualitas tinggi.

Tujuan penelitian untuk mengetahui konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, atau 25%) yang terbaik sebagai krioprotektan ekstraseluler terhadap kualitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi. Hipotesis penelitian adalah konsentrasi susu skim yang terbaik sebagai krioprotektan ekstraseluler terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi adalah 15%.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801)

Ikan gurami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) (Gambar 2.1) merupakan salah satu jenis ikan perairan tawar asli Indonesia. Ikan gurami berasal dari perairan Jawa Barat. Daerah penyebaran ikan gurami yaitu perairan Malaysia, Thailand, dan Australia (Sunarya 2007: 7).

2.1.1 Klasifikasi dan Penyebaran

Klasifikasi ikan gurami (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801) adalah sebagai berikut:

Phylum : Chordata
Subphylum : Vertebrata
Class : Actinopterygii
Order : Perciformes
Suborder : Anabantoidae
Family : Osphronemidae
Genus : *Osphronemus*
Species : *Osphronemus goramy* (Lacepede 1801)
(ITIS 2010: 1).



Gambar 2.1. Ikan gurami jantan (*Osphronemus goramy*, Lacepede 1801)
[Sumber: dokumentasi pribadi.]

2.1.2 Morfologi

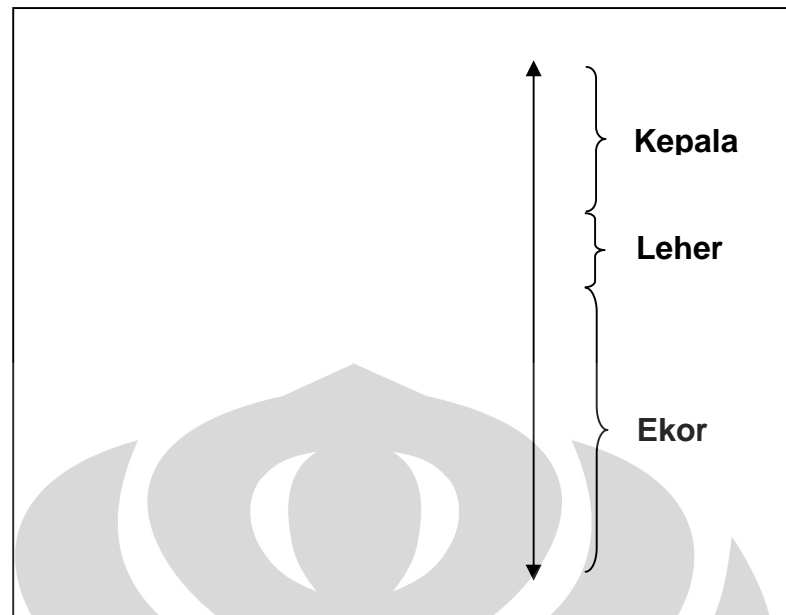
Gurami memiliki bentuk tubuh oval, sedikit memanjang, tinggi, dan pipih ke samping. Gurami memiliki mulut yang berukuran relatif kecil. Rahang bawah gurami terdapat gigi. Gurami memiliki sisik tipe stenoid yang berukuran besar. Gurami memiliki sirip ekor yang membulat. Gurami memiliki sepasang sirip perut yang telah mengalami modifikasi menjadi seperti benang panjang yang berfungsi sebagai alat peraba (Sunarya 2007: 8--9).

Gurami jantan dan betina memiliki beberapa ciri morfologi yang berbeda. Oleh karena itu, gurami jantan dengan gurami betina mudah untuk dibedakan secara visual. Gurami jantan memiliki tonjolan kepala, sedangkan gurami betina tidak memiliki tonjolan kepala. Pangkal sirip dada gurami jantan berwarna keputihan atau terang, sedangkan pangkal sirip dada gurami betina berwarna kehitaman atau gelap. Tutup insang gurami jantan berwarna kekuningan, sedangkan tutup insang gurami betina berwarna kecoklatan. Apabila diletakkan di tempat datar, ekor gurami jantan akan melengkung ke atas, sedangkan ekor gurami betina tetap datar (Sitanggang & Sarwono 2006: 2).

2.2 Spermatozoa Ikan

Spermatozoa adalah sel kelamin jantan. Secara umum, spermatozoa terdiri atas tiga bagian, yaitu kepala, leher (*middle piece*), dan ekor (Gambar 2.2) (Ginzburg 1972: 95). Kepala spermatozoa membawa materi hereditas paternal dan ekor spermatozoa berfungsi sebagai alat gerak (Fujaya 2002: 160 & 166).

Spermatozoa ikan gurami tidak memiliki akrosom. Bentuk kepala, nukleus, dan bagian tengah yang mengandung mitokondria beragam pada setiap spesies. Spermatozoa bagian tengah pada *salmonoid* dan *cyprinid* kurang berkembang, sedangkan pada ikan *guppy* sudah mulai berkembang. Spermatozoa ikan dengan fertilisasi eksternal, imotil pada saat ejakulasi (Rurangwa *dkk.* 2004: 8 & 19). Spermatozoa tersebut menjadi motil ketika dilepaskan ke air (Melo & Godinho 2006: 384).



Gambar 2.2. Morfologi spermatozoa ikan dengan fertilisasi eksternal [Sumber: Changjiang Huang *dkk.* 2004: 296.]

Stimulasi dan lama pergerakan spermatozoa ikan dipengaruhi oleh kematangan spermatozoa, suhu, dan faktor-faktor lingkungan lainnya seperti ion-ion, pH, dan osmolalitas (Fujaya 2002: 160 & 166). Spermatozoa terkandung dalam semen, tersuspensi di dalam cairan *semi-gelatinous* yang disebut sebagai plasma semen (Toelihere 1981: 106 & 108). Spermatozoa ikan dihasilkan dalam *cyste seminiferus*. *Cyste seminiferus* terdapat dalam kantung-kantung pada testis. *Cyste seminiferus* dikelilingi oleh sel-sel Sertoli, sedangkan pada bagian luar terdapat sel Leydig (Fujaya 2002: 160 & 166).

Motilitas spermatozoa pada sebagian besar ikan air tawar dipicu oleh kondisi larutan yang hipotonis (Muchlisin *dkk.* 2004: 31). Peristiwa kejutan hipotonis (*hypotonic shock*) terjadi ketika spermatozoa ikan air tawar terpapar larutan hipotonis (Billard *dkk.* 1995: 102). Hiperpolarisasi membran terjadi sangat cepat dan konsentrasi ion K^+ di luar sel menurun pada peristiwa kejutan hipotonis. Hiperpolarisasi membran merupakan sinyal terjadinya induksi ion Ca^{2+} ke dalam sel. Hal tersebut menyebabkan adenil siklase akan teraktivasi dan mengubah ATP menjadi cAMP. Aksonema diaktifkan oleh cAMP dan pada akhirnya terjadi pergerakan spermatozoa (Alavi & Cosson 2006: 5).

2.3 Pengukuran Kualitas Spermatozoa Ikan

Kualitas spermatozoa dapat diketahui dengan menggunakan beberapa parameter. Parameter motilitas, viabilitas, dan abnormalitas merupakan parameter yang mudah dan umum digunakan dalam penilaian kualitas spermatozoa. Hal tersebut karena motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa merupakan parameter penting dalam penentuan kemampuan spermatozoa membuahi sel telur (Rurangwa *dkk.* 2004: 4).

Parameter yang paling sederhana dan sering dijadikan sebagai patokan dalam penilaian kualitas spermatozoa adalah motilitas (Toelihere 1981: 113). Terdapat tiga metode yang dapat digunakan untuk mengetahui persentase motilitas spermatozoa. Tiga metode tersebut yaitu metode subjektif, metode semi-kuantitatif, metode kuantitatif melalui bantuan komputer. Metode subjektif dilakukan dengan cara menghitung persentase spermatozoa motil, menentukan durasi total pergerakan spermatozoa, atau melalui kombinasi antara keduanya. Metode semi-kuantitatif merupakan pengembangan dari metode subjektif. Metode semi-kuantitatif bertujuan untuk meningkatkan keakuratan dari cara pengukuran motilitas spermatozoa pada metode subjektif. Metode semi-kuantitatif dilakukan dengan cara menganalisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan rekaman video yang diamati oleh dua orang peneliti atau lebih. Metode kuantitatif melalui bantuan komputer adalah metode pengamatan motilitas spermatozoa dengan menggunakan *Computer-Aided Sperm Analysis (CASA)*. Kelebihan dari sistem CASA adalah lebih cepat dan efektif dibandingkan dengan metode yang lain. Kelemahan sistem CASA yaitu tidak aplikatif untuk diterapkan (Rurangwa *dkk.* 2004: 9--11).

Spermatozoa yang hidup atau mati dapat dibedakan berdasarkan reaksinya terhadap zat warna tertentu. Viabilitas spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan pewarnaan. Pewarnaan yang digunakan merupakan pewarnaan diferensial yang mengacu pada kemampuan integritas membran sel (Rurangwa *dkk.* 2004: 7).

Pewarnaan yang umum digunakan untuk pengamatan viabilitas spermatozoa adalah eosin-Y. Spermatozoa yang mati dapat menyerap warna eosin, sehingga akan terlihat berwarna merah pada pengamatan di mikroskop. Hal

tersebut disebabkan karena sel yang mati tidak dapat mempertahankan integritas membran selnya. Spermatozoa yang hidup adalah spermatozoa tidak dapat menyerap warna eosin karena sel tersebut masih dapat mempertahankan integritas membrannya, sehingga tidak terwarnai oleh eosin. Oleh karena itu, spermatozoa yang hidup akan terlihat tidak berwarna (Salisbury & VanDemark 1985: 466).

Abnormalitas spermatozoa juga merupakan parameter penentuan kualitas spermatozoa. Spermatozoa yang abnormal memiliki kualitas yang rendah. Spermatozoa yang abnormal akan sulit bahkan tidak dapat membuahi ovum (Toelihere 1981: 113). Spermatozoa abnormal tidak dapat bergerak dengan baik dan tidak memiliki kemampuan membuahi sel telur sebaik spermatozoa normal (Rurangwa *dkk.* 2004: 8). Jenis abnormalitas yang umum dijumpai adalah abnormalitas pada bagian kepala maupun ekor. Abnormalitas spermatozoa dapat diketahui dengan membuat preparat ulas dari semen (Salisbury & VanDemark 1985: 448). Giemsa dapat digunakan sebagai pewarna dalam pembuatan preparat ulas (Toelihere 1981: 112).

2.4 Kriopreservasi

2.4.1 Definisi

Kriopreservasi adalah teknik penyimpanan materi genetik (termasuk spermatozoa) dalam keadaan beku. Kriopreservasi merupakan metode yang efektif untuk menyimpan spermatozoa dan mempertahankan spermatozoa tersebut untuk tetap hidup dalam waktu yang lama (Kyoung Ho Kang, *dkk.* 2004: 1429). Prinsip utama kriopreservasi adalah mengatur perpindahan air yang melewati membran sel melalui proses dehidrasi dan rehidrasi (Muchlisin 2005: 12). Dehidrasi adalah proses keluarnya air dari dalam sel. Rehidrasi adalah proses masuknya air kembali ke dalam sel. Dehidrasi yang terjadi pada sel dapat menyebabkan kerusakan sel karena sel mengalami kekeringan. Akan tetapi, jika dehidrasi tidak terjadi pada sel, sel juga dapat mengalami kerusakan akibat terbentuknya kristal es. Oleh karena itu, proses dehidrasi yang terjadi harus diimbangi dengan proses rehidrasi. Dehidrasi dapat terjadi dengan penambahan krioprotektan intraseluler. Rehidrasi terjadi akibat kristal es ekstraseluler yang

mencair. Dehidrasi pada sel yang dikriopreservasi terjadi pada saat proses ekuilibrasi dan pembekuan (*freezing*), sedangkan rehidrasi terjadi saat proses pencairan (*thawing*) (Simione 1998: 1; Tambing 2007: 1).

Tujuan utama kriopreservasi adalah menyimpan, memelihara, dan menjamin kelangsungan hidup suatu materi genetik (Tambing 2005: 1--2). Materi genetik yang biasa disimpan dapat berupa spermatozoa, telur, embrio, dan sel somatik (BBPBAT 2008: 1). Teknik kriopreservasi bermanfaat untuk menyediakan stok spermatozoa untuk budidaya atau penelitian, meningkatkan kualitas genetik melalui *selective breeding*, dan untuk sinkronisasi reproduksi (Riley, *dkk.* 2004: 184; Bozkurt *dkk.* 2005: 1; Melo & Godinho 2006: 380).

2.4.2 Faktor-faktor yang Memengaruhi Kriopreservasi

Beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan teknik kriopreservasi spermatozoa antara lain metoda pengkoleksian semen, bentuk kemasan, krioprotektan, ekstender, perbandingan semen dengan pengencer, ekuilibrasi, laju pembekuan, dan pencairan (*thawing*) (Boediono 2007: 3).

2.4.2.1 Metode Pengkoleksian Semen

Metoda pengkoleksian semen dibedakan menjadi dua macam, yaitu metoda *stripping* (pengurutan) dan metoda pembedahan. Metoda pengurutan dilakukan di daerah abdomen hingga keluar cairan berwarna putih (semen) (Melo & Godinho 2006: 381). Metode pembedahan dilakukan dengan cara membedah bagian testis untuk mendapatkan semen (Oteme *dkk.* 1996: 806).

Metode *stripping* (pengurutan) memiliki kelemahan dan keunggulan. Kelemahan metode *stripping* (pengurutan) yaitu semen yang diperoleh dapat terkontaminasi oleh urin, feses, atau lendir. Kelebihan metode *stripping* (pengurutan) yaitu tidak perlu mengorbankan hewan, sehingga pengambilan semen dapat dilakukan berulang kali (Sukumasavin 2008: 158).

Metode pembedahan memiliki kelemahan, yaitu harus mengorbankan hewan sumber semen. Selain hal tersebut, semen yang diperoleh dengan metode pembedahan dapat terkontaminasi darah. Keunggulan metode pembedahan,

semen tidak terkontaminasi oleh urin, feses, ataupun lendir (Sukumasavin 2008: 158).

2.4.2.2 Bentuk Kemasan

Bentuk kemasan yang dapat digunakan bermacam-macam, antara lain adalah ampul, pelet, *straw*, dan *cryotube*. Ampul dapat menyimpan semen sekitar 0,5--1ml. *Straw* merupakan kemasan plastik yang bentuknya menyerupai sedotan. *Straw* dapat menyimpan semen sekitar 0,25--0,5 ml. *Cryotube* terbuat dari bahan plastik dengan tutup berulir. *Cryotube* memiliki ukuran 1,2 --2 ml. *Cryotube* dapat menyimpan semen dengan kapasitas yang lebih besar dibandingkan bentuk kemasan lain, yaitu hingga 2 ml. *Cryotube* lebih praktis digunakan dibandingkan dengan kemasan lain karena untuk membuka dan menutup *cryotube* hanya dilakukan dengan cara memutar penutupnya (Simione 1998: 4). *Cryotube* memerlukan tempat penyimpanan khusus (*cryotube rack*) untuk menjaga agar tetap dalam keadaan berdiri tegak dan aman. Hal tersebut menjadi kelemahan *cryotube* jika digunakan dalam kriopreservasi di dalam *freezer*. Kemasan yang digunakan untuk kriopreservasi terbuat dari bahan plastik atau gelas. Kemasan tersebut memiliki nilai toleransi yang tinggi terhadap suhu yang sangat rendah (Sukumasavin 2008: 156).

2.4.2.3 Krioprotektan

Krioprotektan adalah senyawa yang mampu mencegah pembentukan kristal es pada proses kriopreservasi (Boediono 2007: 7). Krioprotektan dapat meminimalkan kerusakan sel yang disebabkan oleh terbentuknya kristal es pada tahap pembekuan. Krioprotektan dibedakan menjadi dua macam, yaitu krioprotektan intraseluler (*permeating cryoprotectant*) dan krioprotektan ekstraseluler (*nonpermeating cryoprotectant*). Krioprotektan intraseluler adalah krioprotektan yang dapat keluar masuk sel melalui membran sel. Contoh krioprotektan intraseluler adalah DMSO, gliserol, dan metanol (Kusuda *dkk.* 2004: 171). Krioprotektan intraseluler dapat menurunkan tingkat difusi air dalam sel, serta dapat mengurangi peningkatan konsentrasi garam dan volume sel (Leung 1991: 240). Krioprotektan ekstraseluler adalah krioprotektan yang tidak dapat

keluar masuk sel. Contoh krioprotektan ekstraseluler adalah polimer, sukrosa, dan protein (susu skim dan kuning telur) (Smith. 2003: 1).

2.4.2.4 Ekstender

Ekstender adalah pelarut yang dapat mempertahankan daya hidup sel selama pembekuan (Leung & Jamieson 1991: 256). Ekstender berfungsi sebagai sumber nutrisi, regulator pH, dan tekanan osmotik spermatozoa (Riley *dkk.* 2004: 184). Ekstender mengandung bahan-bahan organik dan senyawa-senyawa garam. Ekstender dapat dikelompokkan menjadi dua macam. Ekstender tersebut adalah ekstender sederhana yang hanya mengandung satu bahan kimia dan ekstender kompleks yang mengandung lebih dari satu bahan kimia terlarut (Sukumasavin 2008: 154). Ekstender yang hanya mengandung satu bahan kimia contohnya NaCl, glukosa, dan fruktosa. Ekstender yang mengandung lebih dari satu bahan kimia terlarut contohnya *Fish Ringer's Solution* (FRS), *Hank Balanced Salt Solution* (HBSS), dan *Immobilizing Solution* (IMMO).

2.4.2.5 Rasio Pengenceran Semen dengan Pengencer

Perbandingan semen dan pengencer yang tepat dapat meningkatkan ketahanan hidup spermatozoa. Pengencer pada kriopreservasi merupakan campuran ekstender dan krioprotektan. Berdasarkan penelitian Harvey (1983: 315) digunakan rasio semen:pengencer 1:5 untuk semen *zebra fish*. Hovarth *dkk.* (2003: 458) menggunakan rasio semen:pengencer 1:9 untuk semen ikan mas.

2.4.2.6 Ekuilibrase

Ekuilibrase adalah waktu yang dibutuhkan pengencer untuk masuk ke dalam sel (Riley, *dkk.* 2004: 185). Ekuilibrase berfungsi mengadaptasikan spermatozoa terhadap perubahan suhu yang dratis sebelum pembekuan. Ekuilibrase bertujuan menghindari kematian spermatozoa akibat perubahan suhu secara dratis (Toelihere 1993: 99). Suhu dan lama ekuilibrase tergantung dari krioprotektan yang digunakan. Waktu ekuilibrase yang baik tidak lebih dari 60

menit karena krioprotektan dapat menjadi racun terhadap sel jika waktu ekuilibrasi terlalu lama (Simione 1998: 4).

2.4.2.7 Laju Pembekuan

Laju pembekuan dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu laju pembekuan lambat dan laju pembekuan cepat. Laju pembekuan dapat memengaruhi laju pembentukan dan ukuran kristal es. Laju pembekuan cepat terjadi jika suatu sel mengalami pembekuan ketika cairan sel belum terdehidrasi. Laju pembekuan lambat terjadi jika suatu sel mengalami pembekuan ketika cairan sel telah terdehidrasi. Laju pembekuan lambat dapat mengurangi pembentukan kristal es intraseluler namun dapat menyebabkan terjadinya dehidrasi. Laju pembekuan cepat dapat mengurangi dehidrasi sel, namun dapat menyebabkan meningkatnya pembentukan kristal es intraseluler (Simione 1998: 4).

Laju pembekuan lambat dan laju pembekuan cepat memiliki nilai yang berbeda. Nilai laju pembekuan lambat adalah sebesar $0,67^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. Laju pembekuan cepat memiliki nilai sebesar $10\text{--}16^{\circ}\text{C}/\text{menit}$.

2.4.2.8 Pencairan (*Thawing*)

Proses pencairan (*thawing*) dilakukan setelah semen dibekukan. Pencairan (*thawing*) adalah proses pencairan kembali semen yang telah dibekukan. Proses pencairan biasanya dilakukan dengan cepat. Fungsi proses pencairan yang cepat adalah mengurangi kerusakan sel akibat pembentukan kembali kristal es. Pencairan menyebabkan air kembali berdifusi ke dalam sel. Proses pencairan terhadap spermatozoa ikan mas dilakukan pada suhu $39\text{--}40^{\circ}\text{C}$ selama 13 detik (Hovarth *dkk.* 2003: 458), sedangkan pencairan terhadap spermatozoa ikan nilam dilakukan pada suhu $39\text{--}40^{\circ}\text{C}$ selama 10--15 detik (Sunarma *dkk.* 2007: 4).

2.5 Metanol

Metanol juga dikenal sebagai metil alkohol, *wood alcohol*, atau spiritus. Metanol memiliki ciri-ciri umum mudah menguap, tidak berwarna, dan mudah terbakar (*flammable*). Metanol diproduksi secara alami melalui metabolisme

anaerobik oleh bakteri. Hasil proses tersebut adalah uap metanol (dalam jumlah kecil) di udara. Uap metanol tersebut akan teroksidasi oleh oksigen dengan bantuan sinar matahari menjadi karbon dioksida dan air. Metanol juga disebut sebagai *wood alcohol* karena metanol merupakan produk samping dari distilasi kayu (McGuigan 2003: 2--3).

Metanol merupakan bentuk alkohol yang paling sederhana. Metanol adalah senyawa kimia yang memiliki rumus kimia CH_3OH . Metanol memiliki berat molekul 32,04 g/mol. Metanol memiliki titik didih $64,7^\circ\text{C}$ (337,8 K) dan titik leleh -97°C (176 K) (McGuigan 2003: 3).

Metanol memiliki ukuran molekul yang relatif kecil, sehingga metanol dapat berdifusi masuk ke dalam sel melalui membran sel. Oleh karena itu, metanol tergolong sebagai krioprotektan intraseluler (Singsee *dkk.* 2005: 207). Penelitian kriopreservasi menggunakan metanol sebagai krioprotektan intraseluler telah banyak dilakukan, terutama pada kriopreservasi spermatozoa ikan. Horvath *dkk.* (2003: 459) menyatakan bahwa metanol telah berhasil digunakan dalam kriopreservasi spermatozoa ikan *Danio rerio*.

Metanol merupakan senyawa *enhancer* yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sel. Senyawa *enhancer* berpenetrasi ke dalam sel dengan cara membuat celah pada membran sel (DPKCL 2000: 2). Pembentukan celah pada membran sel tersebut diawali dengan penempelan molekul-molekul dari senyawa *enhancer* di bawah *lipid headgroups* dari membran *phospholipid bilayer*. Penempelan tersebut menyebabkan ruang antar *headgroups* meningkat. Oleh sebab itu, membran sel mengalami penurunan rigiditas (Lee *dkk.* 2004: 6). Penurunan rigiditas membran sel menyebabkan membran menjadi lebih lentur dan permeabilitas membran meningkat. Penurunan rigiditas tersebut juga membuat membran lebih tahan terhadap stres mekanik selama proses kriopreservasi (Li Jun *dkk.* 2006: 371).

2.6 Susu Skim

Susu skim adalah susu dengan kandungan lemak yang sangat rendah. Kandungan lemak pada susu skim berkisar antara 0--1% lemak. Susu skim berasal dari susu *fullcream*. Susu *fullcream* tersebut diambil sebagian atau seluruh

bagian krimnya. Krim merupakan bagian berlemak pada susu (Oberweis 2001: 2). Zat-zat yang terkandung pada susu skim sama pada susu *fullcream* kecuali lemak dan vitamin-vitamin yang larut dalam lemak (Smith 2003: 1).

Kandungan susu skim pada dasarnya sama dengan jenis susu lain kecuali kandungan lemaknya. Komponen selain lemak yang terkandung dalam susu secara umum yaitu 85,5--88,7% air; 3,25% protein; 4,6% laktosa; 0,65% mineral (meliputi Ca, P, Mg, K, Na, ZnCl, Fe, Cu, dll.); 0,18% asam (sitrat, asetat, laktat, dan oksalat), enzim (peroksidase, katalase, fosfatase, dan lipase), gas (oksigen dan nitrogen), dan vitamin (A, C, D, tiamin, dan riboflavin) (Goff 1995b: 1--2). Protein pada susu skim juga sama dengan jenis susu lain. Protein susu terdiri atas dua macam, yaitu protein serum (*whey protein*) dan kasein. Lebih dari 80% jumlah protein dalam susu adalah kasein (Varnam & Sutherland 2001: 8). Susu mengandung laktenin yang bersifat racun terhadap spermatozoa. Sifat racun laktenin dapat dihilangkan dengan cara memanaskan susu (Salisbury & VanDemark 1985: 588).

Susu skim berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler karena mampu meningkatkan ketahanan spermatozoa selama proses kriopreservasi. Susu skim mengandung protein (kasein) yang berfungsi sebagai pelindung spermatozoa. Penelitian mengenai penggunaan susu skim dengan konsentrasi 15% telah dilakukan oleh Harvey (1983: 315) pada semen *Sarotherodon mossambicus* dengan hasil motilitas sebesar $\pm 70\%$ pascakriopreservasi. Penelitian yang telah dilakukan oleh Nai-Hsien Chao *dkk.* (1987: 108) menunjukkan bahwa susu skim dengan konsentrasi 15% untuk kriopreservasi spermatozoa ikan tilapia mampu mempertahankan motilitas hingga 80%.

BAB 3 BAHAN DAN CARA KERJA

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika dan rumah kaca, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penelitian berlangsung selama enam bulan dari bulan November 2009 sampai dengan bulan April 2010.

3.2 Bahan

3.2.1 Spermatozoa

Spermatozoa diperoleh dari ikan gurami yang telah matang gonad berjumlah 24 ikan dengan kisaran berat 2,5--3,5 kg. Umur ikan gurami antara 2--3 tahun. Ikan gurami diperoleh dari tempat pembudidayaan ikan di Parung, Bogor. Ikan gurami tersebut dipelihara di kolam berukuran 4 m³ dan kedalaman air setinggi ± 50 cm (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Tempat pemeliharaan ikan gurami
[Sumber: dokumentasi pribadi.]

3.2.2 Pakan Ikan Gurami

Ikan gurami diberi pakan daun sente (*Alocasia macrorrhiza*, Schott) (Gambar 3.2) dan pakan buatan berupa pelet apung [Ransum-SP RNLa b 4] produksi PT Japfa Comfeed Indonesia Tbk.



Gambar 3.2. Daun sente (*Alocasia macrorrhiza*, Schott)
[Sumber: dokumentasi pribadi.]

3.2.3 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah larutan *fish Ringer* (250 ml ddH₂O, 1,625 g NaCl, 0,0625 g KCl, 0,0875 g CaCl₂.2 H₂O, dan 0,05 g NaHCO₃), susu skim [Diamond], metanol [Merck], hormon analog GnRH yang dikombinasikan dengan domperidon [Ovaprim Syndel], larutan aktivator (150 ml akuabides steril, 0,2633 g NaCl, 0,0373 g KCl, 0,4727 g Tris pH 8), eosin-Y 0,5%, obat anti jamur (*methylene blue*), akuades steril, dan alkohol 70%.

3.2.4 Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah *aluminium foil*, es batu, kertas label, kertas tisu, kertas pH skala 6,5--10 [Merck], serta sarung tangan [Sensi gloves].

3.3 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi pipet mikro volume 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, dan 100-1000 μ l [BOECO & Eppendorf], timbangan digital [Precisa], lemari pendingin [Hauknecht], *freezer* [Daiichi DCF 126], *tips* [Fisherbrand[®] & Sorenson], *cryotube vials* 0,5 ml [Sorenson], *improved* Neubauer [Marienfeld], kaca objek, kaca penutup, *counter* [Joy-art], *disposable syringe* 20 cc tanpa jarum [TERUMO], *disposable syringe* 3 cc dengan jarum [TERUMO], *beaker glass* 50 ml dan 100 ml [IWAKI Pyrex[®]], gelas ukur 100 ml [IWAKI Pyrex[®]], batang pengaduk, kamera digital [Olympus μ -850 SW], *laptop* [Acer TravelMate 3252WMXi], *stop watch* [Casio LW-E11], bak plastik, mikroskop binokuler [BOECO BM-180], mikroskop trinokuler [BOECO BM-180] yang terhubung dengan kamera digital [MDCE-5A], *software driver* kamera digital [MDCE-5A], *software SPSS 15 for Windows[®]*, *waterbath*, botol kaca, wadah gelas, dan termometer.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Perlakuan pada Penelitian

Penelitian bersifat eksperimental dengan perlakuan berupa variasi konsentrasi susu skim sebesar 0% (kontrol), 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Jumlah ulangan ditentukan berdasarkan rumus Frederer yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$, t adalah jumlah perlakuan dan r adalah jumlah ulangan (Hanafiah 2004: 12). Oleh karena itu, untuk 6 perlakuan diperlukan minimal 4 ulangan. Keenam perlakuan tersebut yaitu:

- a. Semen dengan penambahan metanol konsentrasi 10% tetapi tidak ditambahkan susu skim atau perlakuan kontrol (SS 0%).

- b. Semen dengan penambahan metanol konsentrasi 10% dan konsentrasi susu skim sebesar 5% sebagai perlakuan susu skim 5% (SS 5%).
- c. Semen dengan penambahan metanol konsentrasi 10% dan konsentrasi susu skim sebesar 10% sebagai perlakuan susu skim 10% (SS 10%).
- d. Semen dengan penambahan metanol konsentrasi 10% dan konsentrasi susu skim sebesar 15% sebagai perlakuan susu skim 15% (SS 15%).
- e. Semen dengan penambahan metanol konsentrasi 10% dan konsentrasi susu skim sebesar 20% sebagai perlakuan susu skim 20% (SS 20%).
- f. Semen dengan penambahan metanol konsentrasi 10% dan konsentrasi susu skim sebesar 25% sebagai perlakuan susu skim 25% (SS 25%).

3.4.2 Pemeliharaan Ikan Gurami

Induk gurami jantan dipelihara dalam kolam yang terbuat dari semen berukuran 4 m³ dengan kedalaman air \pm 50 cm. Suhu air berkisar antara 25--33° C. Induk diberi pakan secara intensif. Pakan yang diberikan kepada induk gurami berupa pakan alami (daun sente) dan pakan buatan (pelet). Pakan diberikan secara teratur sebanyak dua kali sehari pada pagi dan sore hari.

3.4.3 Pembuatan Larutan Aktivator

Pembuatan larutan aktivator dilakukan berdasarkan Sunarma *dkk.* (2007a: 4) dan Urbanyi *dkk.* (2006: 201) yang dimodifikasi. Larutan aktivator terdiri atas 0,2633 g NaCl, 0,0373 KCl, 0,4727 g Tris-HCl pH 8 yang dilarutkan dalam akuades hingga 100 ml. Larutan aktivator disimpan di dalam lemari pendingin bersuhu 4° C (Draper *dkk.* 2008: 3).

3.4.4 Pembuatan Ekstender *Fish Ringer*

Pembuatan ekstender *fish Ringer* sesuai dengan Ginsburg (Tabel 3.1) (lihat Draper *dkk.* 2008: 3). Komposisi ekstender *fish Ringer* dapat dilihat pada Tabel 3.1. Stok ekstender *fish Ringer* dibuat dengan melarutkan bahan ke dalam akuabides steril hingga volume mencapai 500 ml. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol kaca yang tertutup rapat dan disimpan di dalam lemari pendingin

bersuhu 4 °C dengan lama penyimpanan maksimal tiga hari (Draper *dkk.* 2008: 3).

Tabel 3.1. Komposisi ekstender *fish* Ringer yang digunakan dalam penelitian

Komposisi	Berat
NaCl	3,250 g
KCl	0,125 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,175 g
NaHCO ₃	0,100 g
ddH ₂ O	ditambahkan hingga 500 ml

[Sumber: Draper *dkk.* 2008: 3.]

3.4.5 Pembuatan Larutan Pengencer

Larutan pengencer terdiri atas susu skim, metanol, dan ekstender *fish* Ringer. Pembuatan larutan pengencer dilakukan dalam tiga tahap. Tahap pertama yaitu tahap pencampuran ekstender *fish* Ringer dengan metanol. Tahap kedua yaitu pemanasan susu skim. Tahap ketiga yaitu pencampuran semua komponen pengencer yang meliputi susu skim, ekstender *fish* Ringer, dan metanol. Jumlah tiap komponen dalam pengencer dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3.2. Pengenceran semen

Susu skim (%)	Metanol 10% (μl)	Ekstender <i>fish</i> Ringer (μl)	Semen (μl)	Susu skim (μl)
0%	50	400	50	0
5%	50	375	50	25
10%	50	350	50	50
15%	50	325	50	75
20%	50	300	50	100
25%	50	275	50	125

Pemanasan susu skim cair dilakukan dengan menempatkan susu skim tersebut di dalam botol kaca terbuka. Susu skim dalam botol kaca terbuka kemudian dipanaskan (direndam) dalam wadah gelas berisi air panas dengan suhu sekitar 87--97° C. Pemanasan susu skim dilakukan selama 1 menit. Setelah proses pemanasan susu disimpan di tempat yang dingin (lemari es) (Thacker & Almquist 1952: 174--175).

3.4.6 Pembuatan Larutan Eosin-Y 0,5%

Larutan eosin-Y 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 g eosin-Y ke dalam akuades steril hingga volume larutan mencapai 100 ml (WHO 1988: 36). Larutan disimpan di tempat yang tidak terpajan langsung oleh sinar matahari.

3.4.7 Pembuatan Larutan 0,15 M Dapar Fosfat pH 6,8

Larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8 dibuat dengan mencampur dua macam larutan yaitu larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan larutan KH_2PO_4 . Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dibuat dari 5,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam akuades hingga larutan mencapai 200 ml. Larutan KH_2PO_4 dibuat dari 4,08 g KH_2PO_4 yang dilarutkan dalam akuades hingga larutan mencapai 200 ml. Larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8 didapat dengan cara menambahkan sedikit demi sedikit larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam larutan KH_2PO_4 hingga pH larutan mencapai nilai 6,8. pH larutan tersebut dapat diukur dengan menggunakan pengukur pH [Consort Multiparameter Analyzer] (WHO 1988: 36).

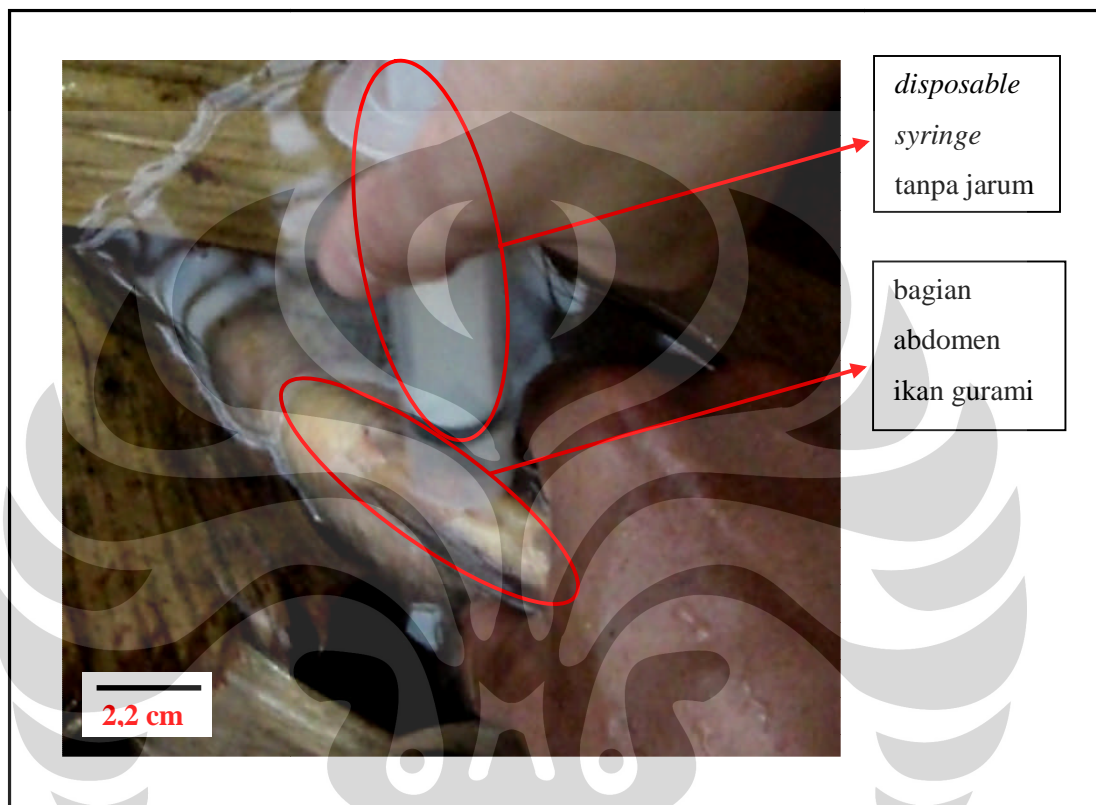
3.4.8 Pembuatan Larutan Giemsa

Larutan Giemsa dibuat dengan melarutkan satu bagian larutan stok Giemsa dengan 10 bagian larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8 yang kemudian disaring menggunakan kertas saring.

3.4.9 Induksi Hormon

Induksi hormon dilakukan berdasarkan metode Sunarma *dkk.* (2007b: 3) yang dimodifikasi. Induksi hormon dilakukan 8--10 jam sebelum dilakukan

pengambilan sampel semen. Induk gurami jantan disuntik dengan hormon analog GnRH yang dikombinasikan dengan domperidon (0,2 ml/kg berat badan) secara *intramuscular*, melalui otot di pangkal sirip punggung. Induksi hormon dilakukan sebelum pengambilan semen dengan cara pengurutan (*stripping*).



Gambar 3.3. Metode pengkoleksian semen dengan cara *stripping*
[Sumber: dokumentasi pribadi.]

3.4.10 Pengambilan Sampel Semen

Pengambilan sampel semen dilakukan dengan cara menempatkan ikan gurami ke dalam bak air dengan volume air 3/4 dari bak air. Pengkoleksian semen dilakukan dengan metoda pengurutan (*stripping*) pada bagian perut (abdomen) ke arah urogenital hingga semen keluar (Gambar 3.3). Sebelum pengambilan semen, bagian urogenital dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan kertas tisu agar tidak terlalu banyak terkontaminasi urin, lendir, dan feses (Melo & Godinho 2006: 381). Semen yang keluar segera diambil dengan

menggunakan *disposable syringe* tanpa jarum dan segera dimasukkan ke dalam *cryotube*.

3.4.11 Pengenceran

Semen diencerkan dengan larutan pengencer. Perbandingan semen dan larutan pengencer adalah 1:9 (Hovarth *dkk.* 2003: 457; Sunarma *dkk.* 2007a: 4). Larutan pengencer dimasukkan ke dalam *cryotube* yang masing-masing telah diberi label. Semen juga dimasukkan dengan menggunakan pipet mikro berukuran 100 μ l. Campuran semen dan pengencer tersebut di homogenkan dengan cara mengeluarkan dan menghisap larutan sebanyak empat kali dengan menggunakan pipet mikro (Draper 2002: 5).

3.4.12 Ekuilibrasi

Semen yang telah diencerkan dengan ekstender dan metanol di dalam *cryotube* disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4° C. *Cryotube* tersebut disimpan selama 10 menit. Suhu dan lamanya waktu ekuilibrasi berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Hovarth *dkk.* (2003: 457).

3.4.13 Pembekuan (*Freezing*)

Proses pembekuan dilakukan di dalam *freezer* dengan suhu -34° C. Proses pembekuan dilakukan selama 2 hari. Proses kriopreservasi tersebut dilakukan berdasarkan modifikasi dari penelitian Harvey (1983: 315), Jodun *dkk.* (2006: 37), dan Changjiang Huang *dkk.* (2004: 295).

3.4.14 Pencairan (*Thawing*)

Pencairan (*thawing*) dilakukan 2 hari setelah kriopreservasi. Pencairan dilakukan dengan merendam *cryotube* di dalam air bersuhu 40 °C. Pencairan dilakukan selama 1--2 menit hingga mencair. Suhu dan lamanya waktu pencairan berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Riley *dkk.* (2004: 187) Hovarth *dkk.* (2003: 458).

3.4.15 Evaluasi Semen dan Analisis Spermatozoa

3.4.15.1 Evaluasi Semen

Evaluasi semen dilakukan segera setelah pengkoleksian semen (semen segar) dan pascakriopreservasi. Pengamatan dilakukan secara makroskopik maupun mikroskopik (Akcaý *dkk.*2004: 838). Evaluasi makroskopik meliputi volume, warna, dan pH. Evaluasi mikroskopik meliputi motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Evaluasi mikroskopik dan makroskopik dilakukan pada semen segar, sedangkan pada pascakriopreservasi hanya dilakukan pengamatan mikroskopik.

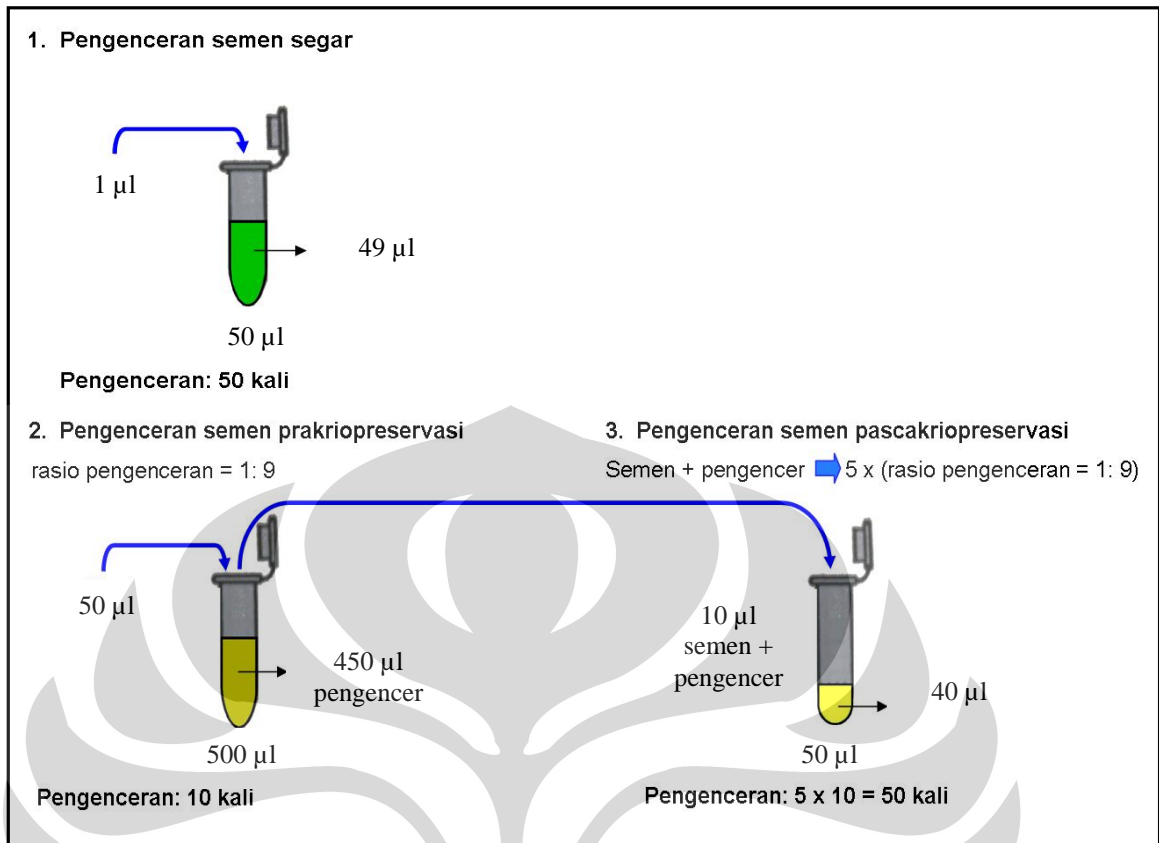
Pengukuran volume semen dilakukan dalam *cryotube* berskala. Warna semen diamati secara visual kemudian dicatat. Pengukuran pH dilakukan dengan mengoleskan semen segar pada kertas indikator pH berskala 6,5--10. Warna yang muncul pada kertas indikator pH dicocokkan dengan standar warna yang tertera pada kemasan kertas indikator pH (WHO 1988: 5--6).

3.4.15.2 Analisis Spermatozoa

Analisis spermatozoa dilakukan pada saat prakriopreservasi dan pascakriopreservasi. Analisis spermatozoa terdiri atas:

3.4.15.2.1 Pengamatan dan Penghitungan Persentase Motilitas Spermatozoa

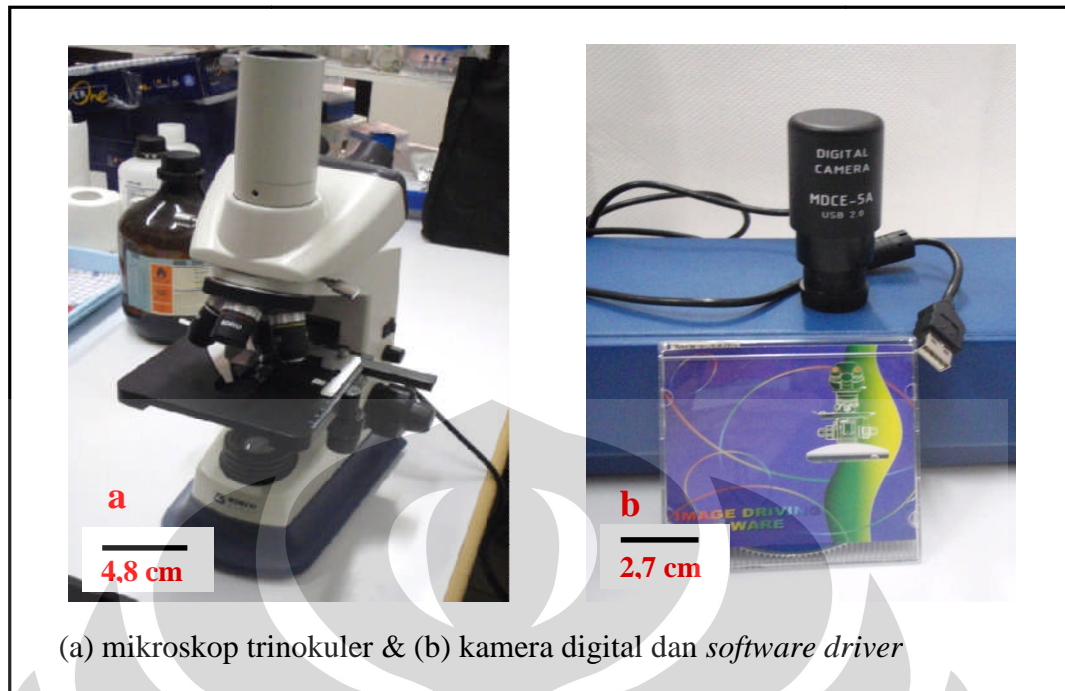
Pengenceran semen untuk pengamatan motilitas spermatozoa segar dilakukan dengan cara mengencerkan semen dengan larutan aktivator hingga 50 kali dengan perbandingan semen : larutan aktivator adalah 1:49 (Sunarma *dkk.* 2007a: 4). Pengenceran semen untuk pengamatan motilitas pascakriopreservasi hampir sama dengan pengenceran semen sebelum kriopreservasi. Perbedaannya adalah untuk mendapatkan pengenceran yang sama yaitu pengenceran sebesar 50 kali (pengenceran sebelum kriopreservasi), setelah diperoleh pengenceran 10 kali karena proses kriopreservasi, ditambahkan 40 µl larutan activator (Gambar 3.4).



Gambar 3.4. Skema pengenceran semen

Metode yang digunakan dalam pengamatan dan penentuan persentase motilitas berdasarkan Salisbury & VanDemark (1985: 460--463) dan Akcay *dkk* (2004: 838). Semen yang telah diencerkan diteteskan pada kamar hitung *improved* Neubauer dan diamati di bawah mikroskop dengan bantuan kamera video (Gambar 3.5) dengan perbesaran 10 x 40. Pengamatan dilakukan pada satu daerah R dalam kamar hitung *improved* Neubauer. Penghitungan persentase motilitas spermatozoa dilakukan sebagai berikut: jumlah spermatozoa imotil dihitung terlebih dahulu, setelah semua spermatozoa tidak bergerak, jumlah spermatozoa total dihitung. Persentase motilitas dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ motilitas} = \frac{\sum \text{ spermatozoa total} - \sum \text{ spermatozoa imotil}}{\sum \text{ spermatozoa total}} \times 100\% \quad (3.1)$$



Gambar 3.5. Alat pengamatan mikroskopik spermatozoa
[Sumber: dokumentasi pribadi.]

3.4.15.2.2 Pengamatan dan Penghitungan Persentase Viabilitas Spermatozoa

Persentase viabilitas spermatozoa ditentukan berdasarkan Salisbury & VanDemark (1985: 466) dan Bearden *dkk.* (2004: 191). Viabilitas spermatozoa diamati dengan meneteskan 10 μ l semen hasil pengenceran 50 kali di atas kaca objek dan dicampur dengan 10 μ l eosin-Y 0,05%, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan di bawah mikroskop dilakukan dengan perbesaran 10 x 40.

Spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh eosin-Y 0,05%. Spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna sehingga berwarna merah. Spermatozoa yang diamati sebanyak 100 sel. Persentase viabilitas spermatozoa dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\Sigma \text{ spermatozoa total} - \Sigma \text{ spermatozoa terwarnai eosin}}{\Sigma \text{ spermatozoa total}} \times 100\% \quad (3.2)$$

3.4.15.2.3 Pengamatan dan Penghitungan Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Persentase abnormalitas dihitung berdasarkan Salisbury & VanDemark (1985: 448). Salisbury & VanDemark (1985: 448) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan preparat ulas. Sebanyak 10 μ l semen dilarutkan dalam 49 μ l ekstender sehingga diperoleh 50 kali pengenceran. Selanjutnya, 10 μ l semen hasil pengenceran 50 kali tersebut diteteskan di atas gelas objek A. Kemudian, ujung gelas objek B diletakkan di atas salah satu bagian tepi gelas objek A membentuk sudut 45°. Gelas objek B digeser sebanyak satu kali ke arah tepi lainnya dari gelas objek A. Oleh karena itu, sampel pada gelas objek A akan terulas.

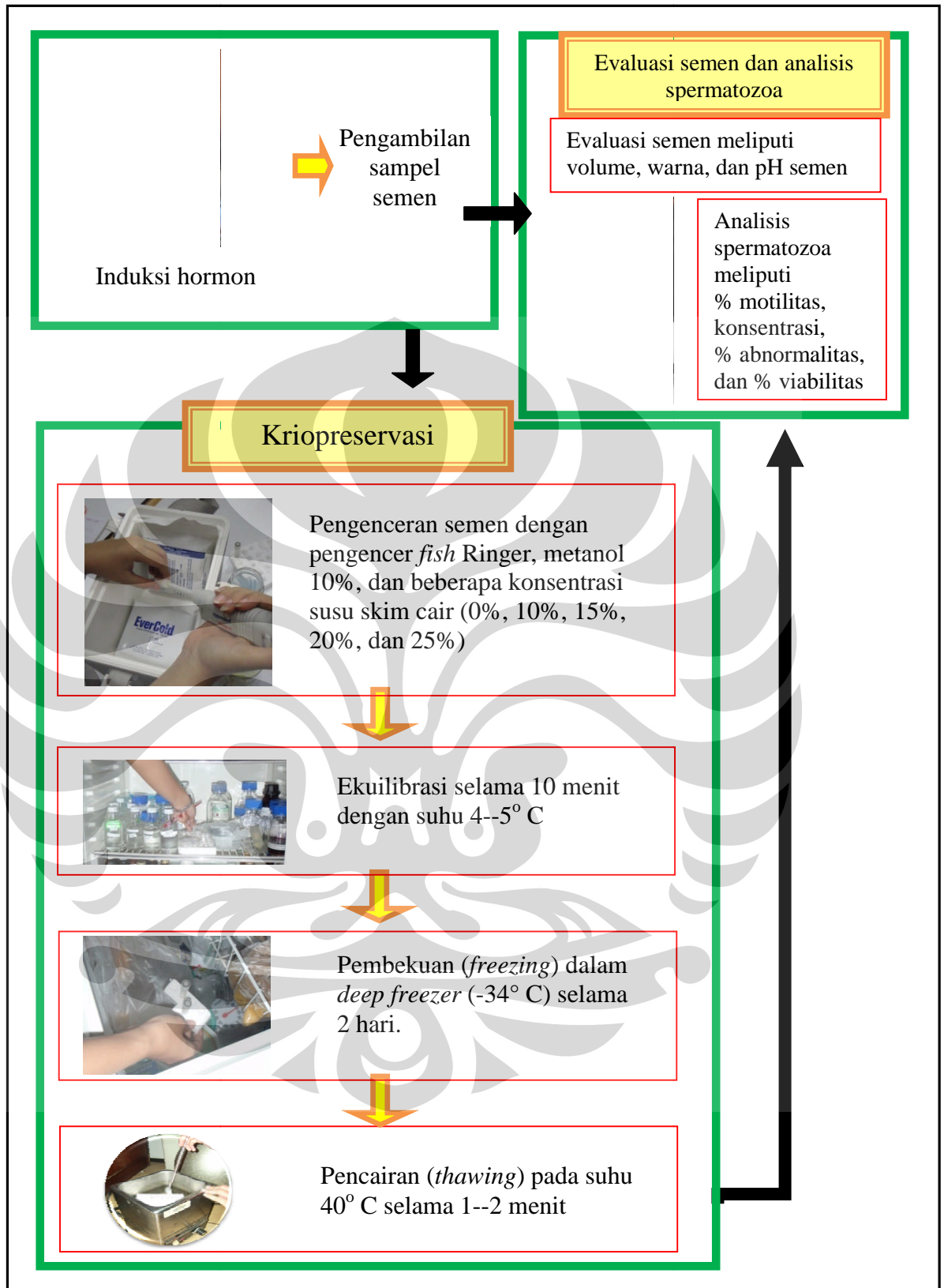
Sediaan tersebut dikeringanginkan dan difiksasi dengan menggunakan metanol selama 3 menit. Sediaan diwarnai dengan perendaman di dalam larutan Giemsa selama 30 menit. Sediaan yang telah direndam di dalam larutan Giemsa selanjutnya dicuci dengan menggunakan air mengalir. Sediaan tersebut kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang. Sediaan tersebut kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Spermatozoa yang diamati yaitu sebanyak 100 sel. Presentase abnormalitas dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ abnormalitas} = \frac{\Sigma \text{ spermatozoa abnormal}}{\Sigma \text{ spermatozoa total}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Abnormalitas spermatozoa umumnya terjadi pada bagian kepala atau ekor. Berdasarkan letak kelainan, maka abnormalitas spermatozoa yang diamati meliputi:

- a: kelainan spermatozoa pada bagian kepala. Kelainan tersebut seperti ukuran kepala lebih besar, lebih kecil, atau tidak berbentuk bulat.
- b: kelainan spermatozoa pada bagian ekor. Kelainan tersebut seperti ekor membelit, patah, menggulung, atau tidak memiliki ekor.
- c: kelainan spermatozoa pada bagian kepala dan ekor.

Skema prosedur penelitian dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 3.6. Skema prosedur cara kerja penelitian

3.4.15.3 Analisis Data

Analisis statistik dilakukan terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Analisis data tersebut dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS)* versi 15 for windows. Data tersebut diuji normalitasnya dengan menggunakan uji Shapiro dan Wilk, kemudian diuji homogenitasnya dengan menggunakan uji Levene. Data yang berdistribusi normal dan bervariasi homogen dilanjutkan diuji dengan uji Analisis Varians (ANOVA) faktor tunggal dan dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda Tukey bila terdapat perbedaan. Data yang tidak berdistribusi normal dan tidak bervariasi homogen harus ditransformasi terlebih dahulu. Apabila data yang telah ditransformasi tetap tidak normal dan homogen, maka dilanjutkan ke uji nonparametrik Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Dunnett untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan (Zar 1974: 131, 133--134, 140--141, 156, 158, & 182).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengamatan Semen Segar Ikan Gurami

4.1.1 Volume, pH, dan Warna Semen

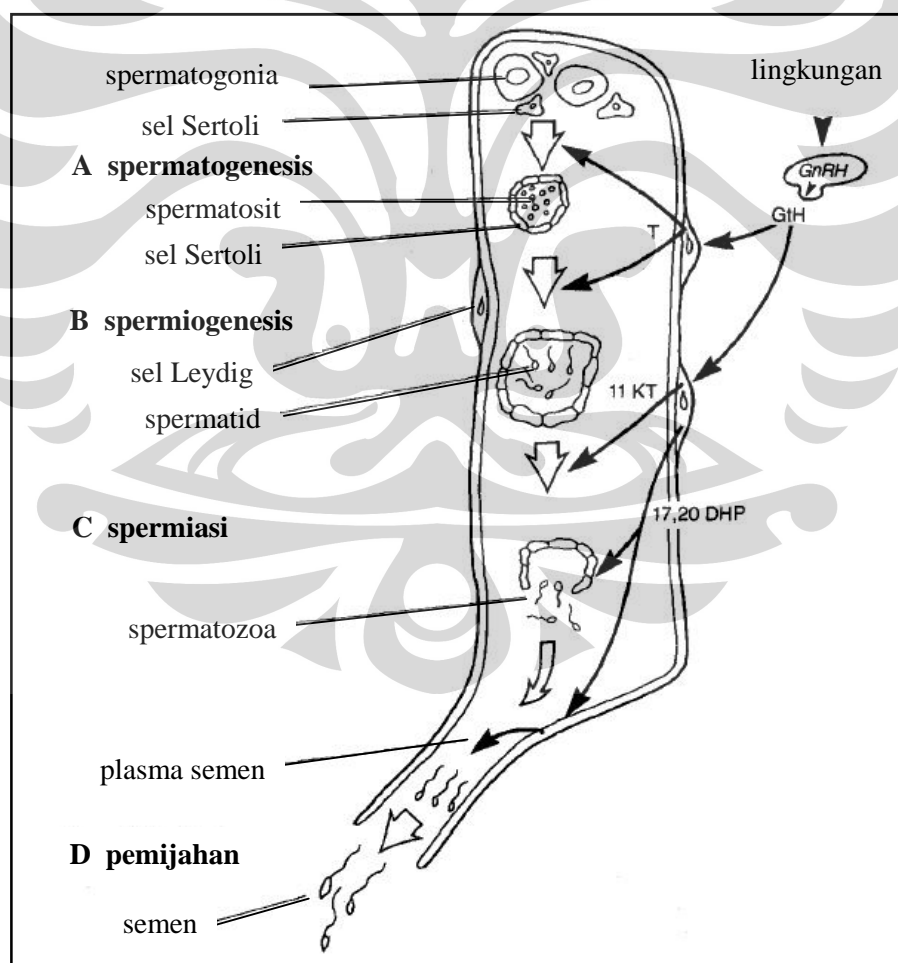
Volume semen segar ikan gurami yang diperoleh dalam penelitian berkisar antara 0,33--0,75 ml perindividu ikan gurami. Ikan gurami yang digunakan memiliki bobot berkisar antara 2,5--3,5 kg. Rata-rata volume semen segar ikan gurami yang diperoleh adalah 0,54 ml (Tabel 4.1). Volume tersebut mendekati jumlah volume ikan gurami berdasarkan penelitian Sunarma *dkk.* (2007b: 4) yang menyatakan volume rata-rata ikan gurami adalah 0,5 ml setelah 15 jam induksi hormon analog GnRH yang dikombinasikan dengan domperidon (antagonis dopamin). Induksi hormon analog GnRH yang dikombinasikan dengan domperidon juga dilakukan dalam penelitian yaitu selama 8--10 jam sebelum pengkoleksian semen.

Induksi hormon pada penelitian dilakukan pada jam 7 pagi, sebelum dilakukan pengkoleksian semen pada jam 4--5 sore. Proses tersebut berdasarkan metode Sunarma *dkk.* (2007a: 3) yang melakukan induksi hormon 8--10 jam sebelum pengkoleksian semen. Induksi hormon analog GnRH yang dikombinasikan dengan domperidon dilakukan untuk mempercepat kematangan gonad pada ikan sehingga ikan menghasilkan semen dengan volume yang lebih banyak jika dibandingkan dengan pengeluaran semen secara alami (Fujaya 2002: 77; Hidayaturrehman 2007: 10).

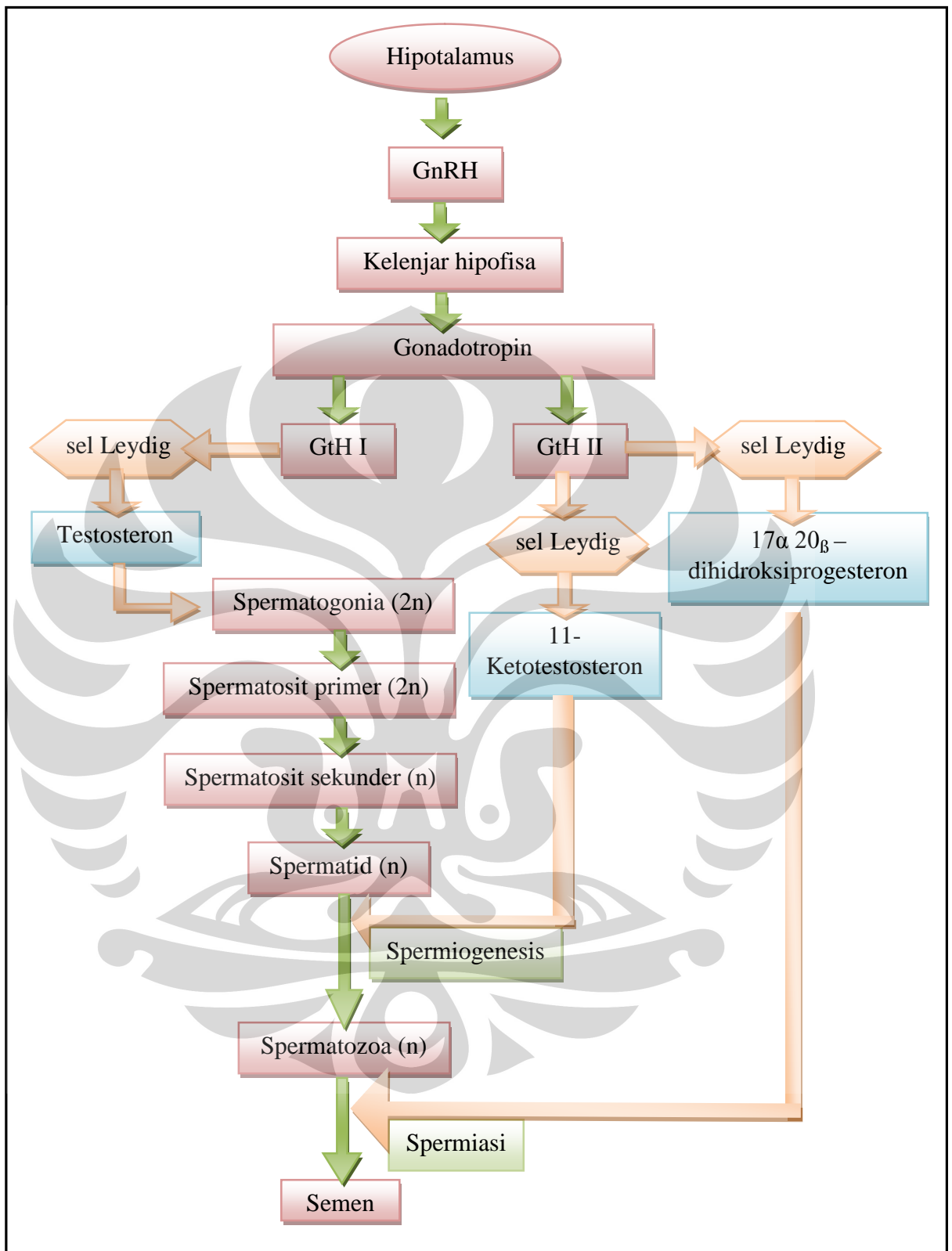
Secara alami, penghasilan semen ikan disebabkan oleh adanya hormon GnRH dari hipotalamus yang merangsang kelenjar hipofisa untuk menghasilkan hormon gonadotropin I dan gonadotropin II. Hormon gonadotropin tersebut kemudian memicu pematangan dan pelepasan spermatozoa (Gambar 4.1) (Harvey & Hoar 1979: 10). Hormon gonadotropin I akan merangsang sel Leydig untuk memproduksi hormon testosteron dan hormon gonadotropin II akan merangsang sel Leydig untuk memproduksi hormon 11-ketotestosteron, dan 17α 20 β -

dihidroksiprogesteron. Hormon testosteron berfungsi merangsang pembelahan spermatogonia menjadi spermatisit hingga spermatid. Hormon 11-ketotestosteron berperan dalam proses spermiogenesis. Hormon 17α 20β -dihidroksiprogesteron berperan dalam proses spermiasi (Gambar 4.2) (Sukumasavin 2008: 138).

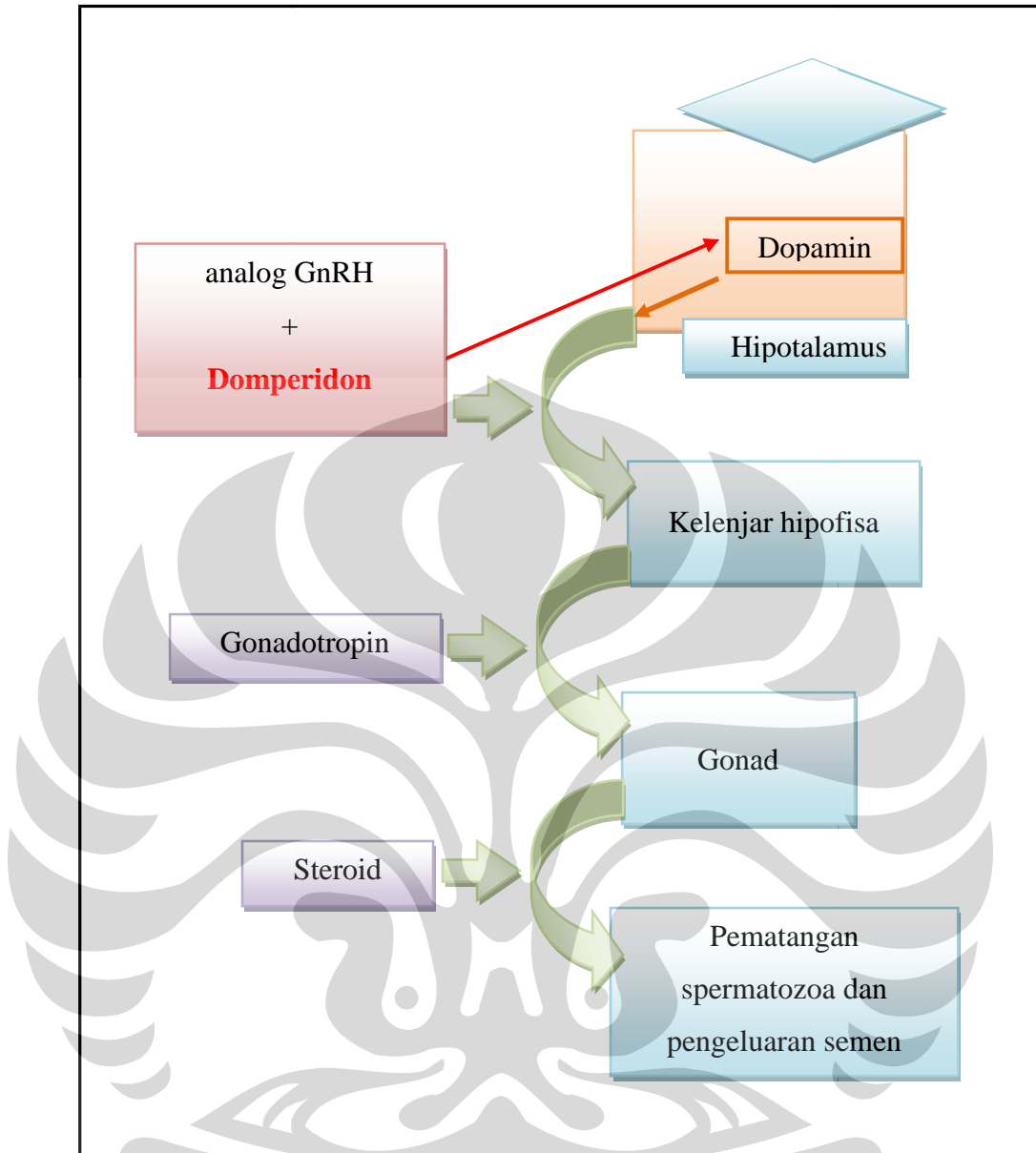
Kerja hormon-hormon tersebut dapat terganggu dengan adanya dopamin. Dopamin menghambat penghasilan GnRH dari hipotalamus (Mukhlas 2009: 5). Hormon yang digunakan dalam penelitian mengandung analog GnRH dan domperidon. Analog GnRH akan menuju kelenjar hipofisa melalui darah. Oleh karena itu, hormon gonadotropin dihasilkan dari kelenjar hipofisa. Domperidon mampu menghambat kerja dopamin, sehingga hormon GnRH dapat dihasilkan dari hipotalamus (Gambar 4.3) (Yanong *dkk.* 2009: 2--3).



Gambar 4.1. Kontrol hormon reproduksi ikan jantan pada *cyste seminiferus* [Sumber: Harvey & Hoar 1979: 28.]



Gambar 4.2. Kontrol hormon reproduksi terhadap pematangan spermatozoa dan spermiasi pada ikan jantan
[Sumber: Sukumasavin 2008: 136.]



Gambar 4.3. Mekanisme kerja hormon analog GnRH yang dikombinasikan dengan domperidon terhadap pematangan spermatozoa dan pengeluaran semen

[Sumber: Yanong *dkk.* 2009: 3.]

Variasi volume semen yang dihasilkan oleh ikan gurami dalam penelitian bervariasi. Menurut Routray *dkk.* (2007: 3) dan Yanong *dkk.* (2009: 6), faktor yang berperan antara lain keadaan lingkungan. Keadaan lingkungan seperti suhu, pH, dan kadar oksigen yang tidak sesuai dapat menyebabkan stres pada ikan sehingga ikan tersebut tidak dapat menghasilkan volume semen dalam jumlah yang banyak.

Hasil pengamatan semen segar ikan gurami selain volume adalah pH. Semen segar ikan gurami yang diperoleh memiliki pH rata-rata 8,03 (Tabel 4.1). Penelitian mengenai pH normal dari semen segar ikan gurami belum pernah dilakukan. Menurut Muchlisin *dkk.* (2004: 31), pH optimum ikan berkisar antara 7,2--8,2. Perbedaan spesies dan individu memengaruhi nilai pH optimum dari semen segar ikan. Variasi pH yang terukur berdasarkan penelitian Muchlisin *dkk.* (2004: 31), pada ikan *grouper* (*Epinephelus malabaricus*) antara 7,5--8, ikan *ayu* (*Plecoglossus altivelis*) sebesar 8, ikan *bagrid catfish* (*Clarias macrocephalus*) sebesar 8, dan ikan *Asian catfish* (*Clarias batrachus*) sebesar 8,2. Berdasarkan Muchlisin *dkk.* (2004: 31), pH ikan gurami dalam penelitian masih tergolong normal.

Warna semen merupakan parameter makroskopik terakhir yang diamati dalam penelitian. Warna semen yang diperoleh adalah warna putih susu (Tabel 4.1). Hasil pengamatan tersebut sesuai dengan pengamatan Sunarma *dkk.* (2007b: 4) bahwa warna semen segar ikan gurami adalah putih susu.

4.1.2 Analisis Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami

4.1.2.1 Persentase Motilitas Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami

Nilai rata-rata persentase motilitas spermatozoa dari semen segar ikan gurami (prakriopreservasi) yang diperoleh dalam penelitian adalah $75,89 \pm 3,65\%$. Data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami prakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.1. Menurut Christensen dan Tiersch (2005: 242), nilai persentase motilitas spermatozoa ikan yang berkualitas baik untuk dikriopreservasi adalah lebih besar dari 70%. Berdasarkan pernyataan Christensen dan Tiersch (2005: 242) tersebut, spermatozoa yang diperoleh dalam penelitian memenuhi syarat untuk dikriopreservasi.

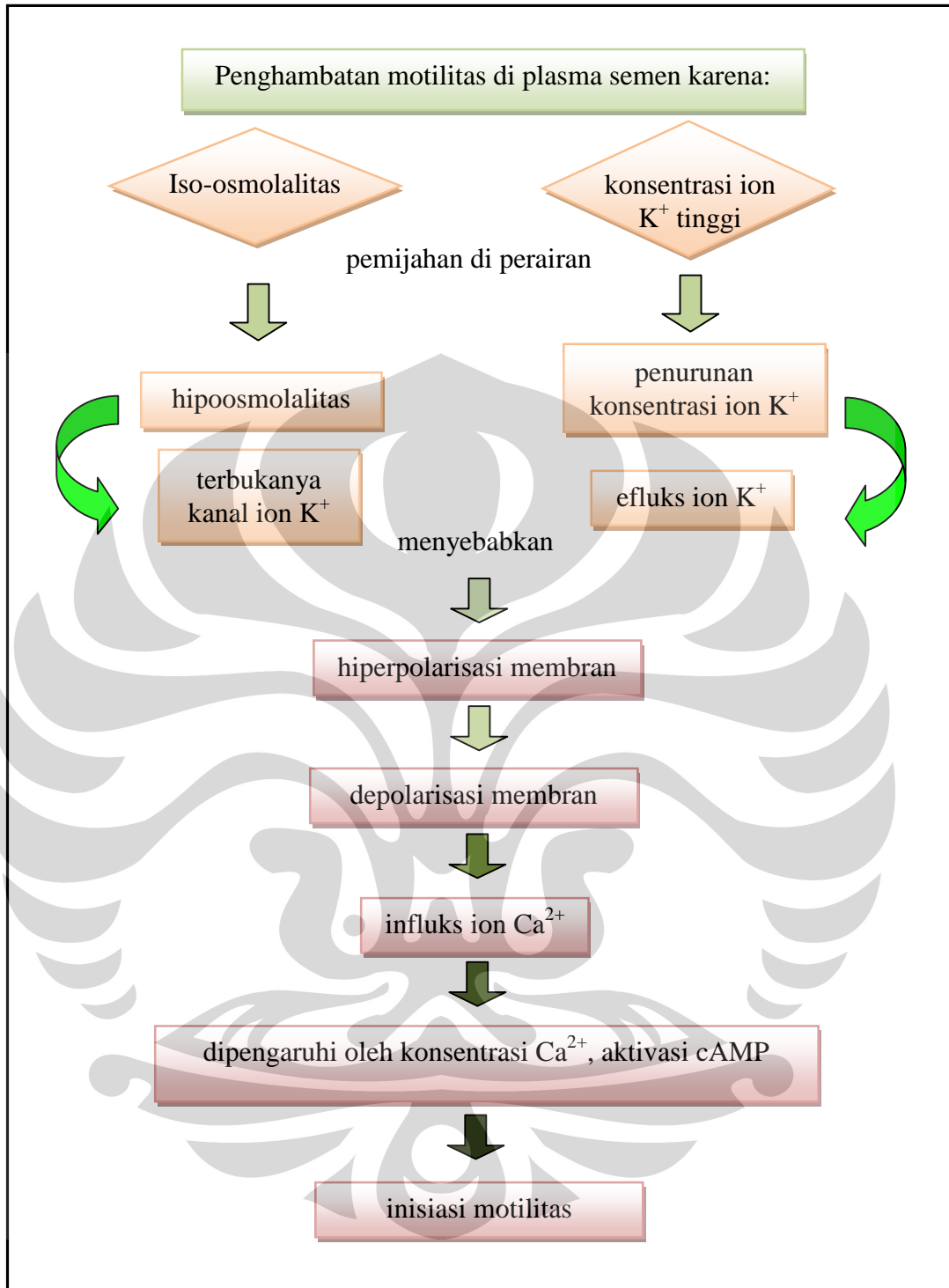
Pengamatan motilitas spermatozoa ikan gurami pada penelitian dilakukan secara visual dan bersifat subjektif. Pengamatan spermatozoa tersebut dilakukan oleh orang yang sama (Salisbury & VanDemark 1985: 460; Rurangwa *dkk.* 2004: 9). Pengamatan motilitas spermatozoa ikan gurami dalam penelitian menggunakan kamar hitung *improved* Neubauer dan dibantu dengan

menggunakan mikroskop yang terhubung dengan komputer melalui video kamera (Muchlisin *dkk.* 2004: 27; Cabrita *dkk.* 2005: 275).

Motilitas spermatozoa diamati dalam penelitian karena motilitas merupakan parameter yang umum digunakan dalam menentukan kualitas spermatozoa. Selain itu, pergerakan (motilitas) spermatozoa berpengaruh penting terhadap fertilisasi (Kyoung Ho Kang *dkk.* 2004: 1432). Motilitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut di antaranya adalah tingkat kematangan dan morfologi spermatozoa. Spermatozoa yang abnormal tidak dapat bergerak secara normal atau bahkan sama sekali tidak mampu bergerak. Spermatozoa yang dikategorikan motil dan dihitug adalah spermatozoa yang bergerak di tempat, bergerak ke depan namun tidak lurus, bergerak ke depan lurus secara perlahan, dan bergerak ke depan lurus dengan cepat (Dada *dkk.* 2001: 108; The Fertility Institutes 2008: 2).

Secara alami, spermatozoa ikan berada dalam kondisi imotil pada plasma semen dan akan menjadi motil jika dilepaskan ke lingkungan (air) (Perhec *dkk.* 1995: 747). Motilitas spermatozoa pada penelitian diinduksi dengan menggunakan larutan aktivator. Larutan aktivator yang digunakan terdiri atas 0,2633 g NaCl, 0,0373 KCl, 0,4727 g Tris-HCl (Sunarma *dkk.* 2007a: 4). Larutan aktivator tersebut memiliki nilai osmolalitas yang lebih rendah (kurang dari 160 mOsm per kg) dibandingkan dengan nilai osmolalitas plasma semen ikan (240--380 mOsm per kg). Nilai osmolalitas merupakan kondisi tekanan osmotik dalam larutan. Kondisi tersebut dipengaruhi oleh jumlah partikel zat terlarut (Perhec *dkk.* 1995: 748--749).

Semen segar ikan gurami (prakriopreservasi) yang diperoleh dalam penelitian ditambahkan dengan larutan aktivator. Hal tersebut menyebabkan perubahan nilai osmolalitas. Perubahan nilai osmolalitas tersebut dapat menginduksi motilitas spermatozoa. Kondisi plasma semen yang isotonis terhadap spermatozoa menjadi hipotonis. Hal tersebut menyebabkan komposisi ion menjadi tidak seimbang (Morita *dkk.* 2005: 4553).



Gambar 4.4. Skema inisiasi motilitas spermatozoa ikan
[Sumber: Alavi & Cosson 2006: 5.]

Kondisi ekstraseluler yang hipotonis menyebabkan terbukannya kanal ion K^+ sehingga konsentrasi ion K^+ pada plasma semen menurun dan terjadi efluks ion

K^+ dan menyebabkan kanal ion K^+ pada membran spermatozoa terbuka. Oleh karena itu, membran spermatozoa akan mengalami hiperpolarisasi.

Hiperpolarisasi membran merupakan peningkatan perbedaan keelektronegatifan antara cairan intraseluler dan cairan ekstraseluler. Cairan intraseluler menjadi bersifat lebih negatif. Kondisi tersebut merangsang membran untuk melakukan depolarisasi. Depolarisasi terjadi melalui proses influks ion Ca^{2+} dan mengakibatkan bertambahnya konsentrasi ion Ca^{2+} . Adenil siklase akan teraktivasi akibat bertambahnya konsentrasi Ca^{2+} . Adenil siklase mengubah ATP menjadi cAMP. Konsentrasi cAMP akan meningkat dan mengaktivasi aksonema (Gambar 4.4) (Morita *dkk.* 2005: 4553--4554; Alavi & Cosson 2006: 5).

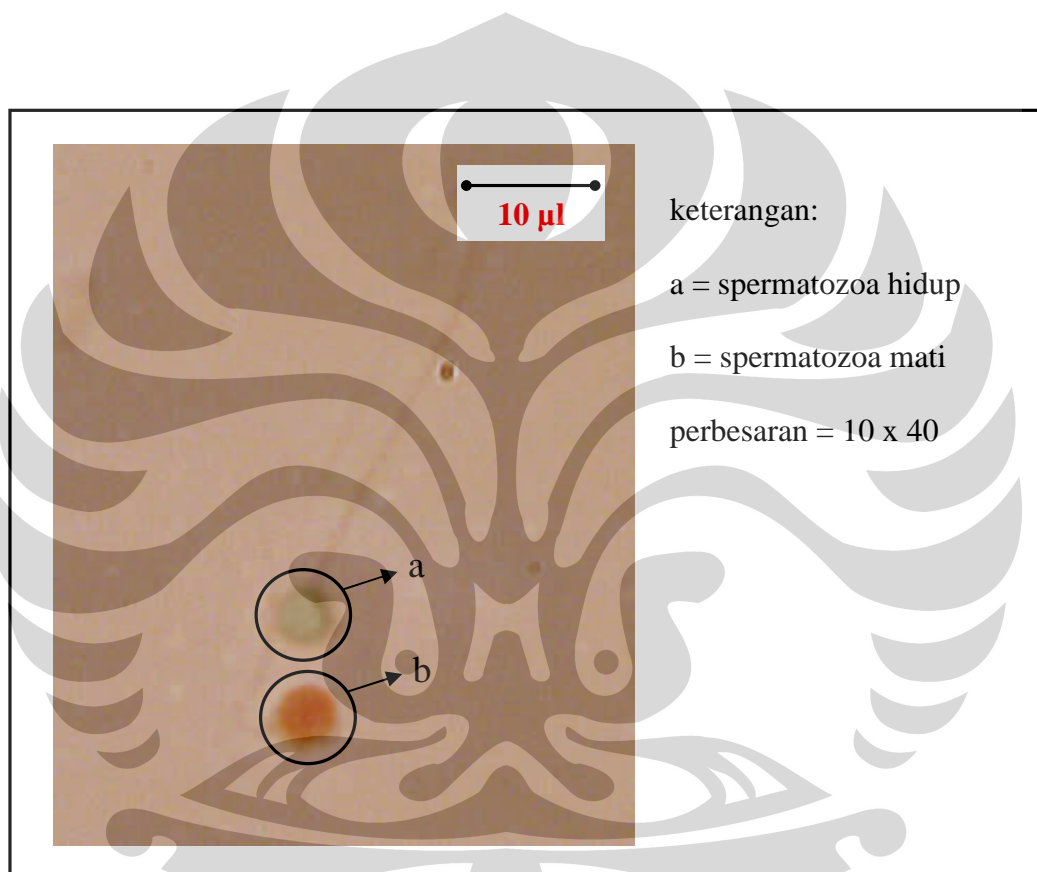
Spermatozoa motil yang teramati pada penelitian, mampu bergerak karena pergerakan bagian ekor spermatozoa. Pergerakan tersebut terjadi karena teraktivasinya aksonema. Aksonema merupakan motor atau penggerak utama ekor spermatozoa. Aksonema terdiri atas mikrotubul-mikrotubul dan lengan *dynein*. Lengan *dynein* menempel pada mikrotubul aksonema dan membuat pergerakan flagel pada ekor spermatozoa (Wolfe 1995: 298; Gazali & Tambing 2001: 28).

4.1.2.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami

Nilai rata-rata persentase viabilitas spermatozoa dari semen segar ikan gurami (prakriopreservasi) yang diperoleh dalam penelitian adalah $83 \pm 3,82\%$. Data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami prakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.1. Nilai tersebut tergolong nilai rata-rata viabilitas yang baik untuk dikriopreservasi. Menurut Cabrita *dkk.* (2005: 278), spermatozoa yang baik untuk dikriopreservasi adalah spermatozoa dengan nilai rata-rata viabilitas diatas 80%.

Viabilitas spermatozoa diamati pada penelitian karena viabilitas merupakan salah satu parameter untuk mengetahui persentase spermatozoa yang hidup. Viabilitas merupakan parameter untuk mengukur kualitas spermatozoa selain motilitas. Spermatozoa yang hidup atau mati dapat dibedakan berdasarkan reaksinya terhadap zat warna tertentu. Viabilitas spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan pewarnaan eosin-Y. Eosin-Y adalah pewarna sel.

Viabilitas spermatozoa terkait dengan keutuhan membran sel. Membran sel pada spermatozoa yang hidup bersifat selektif permeabel termasuk terhadap zat warna. Oleh karena itu, tidak semua zat dapat masuk ke dalam sel yang masih hidup dengan cara melewati membran sel. Eosin-Y tidak dapat mewarnai sel yang masih hidup. Kerusakan membran sel dapat menyebabkan kematian sel tersebut. Sel dengan membran yang rusak akan terwarnai oleh eosin-Y karena zat warna eosin-Y dapat masuk ke dalam sel (Yulnawati & Setiadi 2005: 103).



Gambar 4.5. Viabilitas spermatozoa ikan gurami
[Sumber: dokumentasi pribadi.]

Spermatozoa yang mati dapat menyerap warna eosin-Y, sehingga akan terlihat berwarna merah pada pengamatan di mikroskop. Spermatozoa yang mati tidak dapat mempertahankan permeabilitas dan integritas membran, sehingga eosin-Y dapat masuk ke dalam spermatozoa dengan menembus membran sel. Spermatozoa yang hidup adalah spermatozoa yang tidak dapat menyerap warna eosin-Y, sehingga tidak terwarnai oleh eosin-Y (Gambar 4.5). Oleh karena itu,

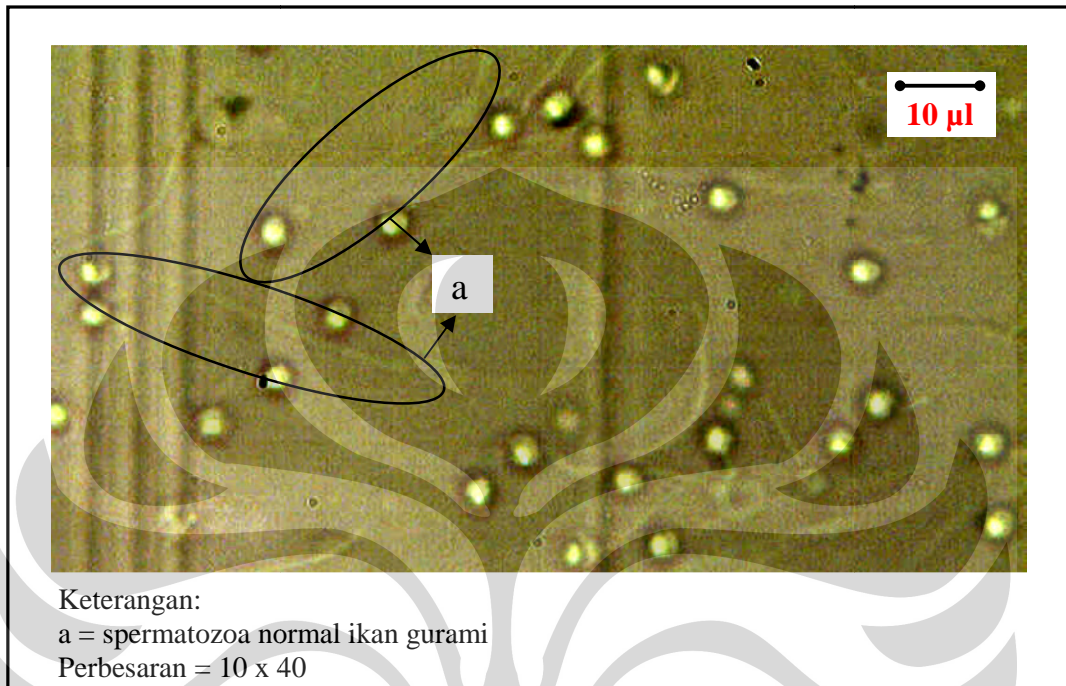
spermatozoa yang hidup akan terlihat tidak berwarna. Spermatozoa yang hidup dapat mempertahankan daya permeabilitas dan integritas membran dengan baik (Salisbury & VanDemark 1985: 466).

4.1.2.3 Persentase Abnormalitas Spermatozoa dari Semen Segar Ikan Gurami

Nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa dari semen segar ikan gurami (prakriopreservasi) yang diperoleh dalam penelitian adalah $13 \pm 2,58\%$. Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami prakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.1. Spermatozoa yang baik untuk dikriopreservasi adalah spermatozoa normal yang memiliki nilai presentase di atas 70% (Azizah & Arifiantini 2009: 64). Nilai rata-rata persentase yang diperoleh dari penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa tersebut memenuhi syarat spermatozoa yang baik dan dapat dikriopreservasi. Abnormalitas spermatozoa ikan gurami diamati dengan menggunakan preparat ulas. Abnormalitas spermatozoa menunjukkan kelainan bentuk pada spermatozoa. Kelainan tersebut dapat memengaruhi spermatozoa untuk melakukan fertilisasi. Spermatozoa yang mengalami kelainan memiliki tingkat keberhasilan yang rendah dalam fertilisasi. Hal tersebut disebabkan oleh pergerakan spermatozoa yang tidak sempurna karena bentuk spermatozoa yang tidak normal (Rurangwa *dkk.* 2004: 8).

Jenis abnormalitas spermatozoa ikan gurami yang umum dijumpai pada penelitian adalah abnormalitas pada bagian kepala maupun ekor spermatozoa. Spermatozoa ikan gurami dengan kelainan pada bagian kepala maupun ekor memiliki morfologi kepala dan ekor yang berbeda dari spermatozoa ikan air tawar normal. Abnormalitas pada bagian kepala spermatozoa yang teramati ditandai dengan bentuk kepala yang panjang dan ukuran kepala spermatozoa yang kecil. Abnormalitas pada bagian ekor spermatozoa yang teramati, ditandai dengan ekor yang putus dan melingkar. Hasil pengamatan tersebut sesuai dengan pernyataan Salisbury dan VanDenmark (1985: 453) bahwa abnormalitas spermatozoa segar pada ikan dapat dijumpai pada bagian kepala, ekor, atau beberapa kombinasi bagian-bagian tersebut. Abnormalitas spermatozoa pada bagian kepala contohnya kepala pipih, mengerut, membesar, memanjang, dan mengecil. Abnormalitas pada bagian ekor contohnya ekor menggulung, patah, dan melingkar.

Spermatozoa ikan gurami yang abnormal teramati memiliki bentuk yang berbeda dari spermatozoa normal (Gambar 4.6).



Gambar 4.6. Spermatozoa normal ikan gurami
[Sumber: dokumentasi pribadi.]

Abnormalitas spermatozoa pada bagian kepala yang teramati pada penelitian dapat disebabkan oleh pengaruh genetik, *inbreeding*, atau perkembangan spermatozoa yang tidak sempurna. Abnormalitas spermatozoa pada bagian ekor yang teramati pada penelitian dapat disebabkan oleh kegagalan perkembangan spermatozoa. Spermatozoa abnormal dengan ciri-ciri ekor yang putus dapat pula disebabkan oleh kesalahan dalam penanganan sampel semen segar pada pemeriksaan spermatozoa atau pada saat pengkoleksian semen. Ekor spermatozoa berbentuk tipis dan memanjang. Oleh karena itu, ekor spermatozoa bersifat rapuh dan sangat rentan terhadap kerusakan (Toelihere 1981: 113; Aditya 2008: 34, 38--39).

Tabel 4.1. Data evaluasi semen dan analisis spermatozoa segar ikan gurami

n	Makroskopis			Mikroskopis		
	Volume (ml)	pH	Warna	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	Abnormalitas (%)
1	0,45	8,00	Putih susu	71,71	81	17
2	0,33	8,00	Putih susu	71,48	77	15
3	0,45	8,00	Putih susu	78,08	83	13
4	0,60	8,10	Putih susu	79,21	84	14
5	0,75	8,00	Putih susu	75,30	87	10
6	0,67	8,10	Putih susu	79,58	87	11
\bar{x}	0,54	8,03	Putih susu	75,89	83	13
SD	0,15	0,05		3,65	3,82	2,58

Keterangan:

n = pengulangan

SD = standar deviasi

\bar{x} = nilai rata-rata

4.2 Pengamatan Spermatozoa Ikan Gurami Dua Hari Pascakriopreservasi

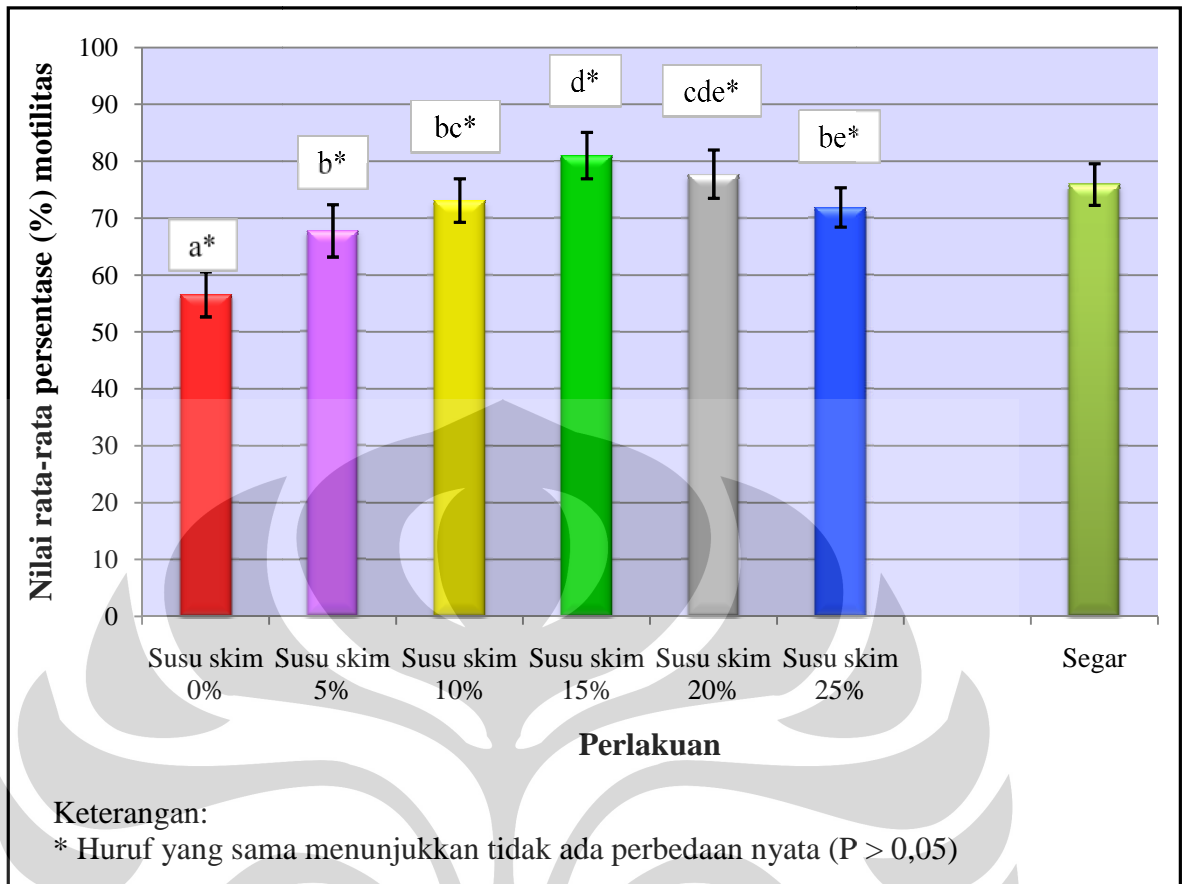
Berdasarkan uji normalitas Shapiro dan Wilk, data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas berdistribusi normal (Lampiran 1). Uji homogenitas Levene menunjukkan bahwa data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas bervariasi homogen (Lampiran 2). Oleh karena itu, data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas dilanjutkan ke uji parametrik. Analisis data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas secara parametrik dilakukan dengan menggunakan uji Analisis Varians (ANOVA) faktor tunggal dan dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda Tukey (Zar 1974: 133--134 & 156; Cabrita *dkk.* 2001: 627).

4.2.1 Persentase Motilitas Spermatozoa Ikan Grami Dua Hari Pascakriopreservasi

Hasil uji Analisis Varians (ANOVA) faktor tunggal terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi menunjukkan bahwa pemberian berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) dalam larutan pengencer dengan metanol 10% memiliki nilai rata-rata persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari

pascakriopreservasi yang berbeda nyata ($P < 0,05$) (Lampiran 3). Hasil uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi menunjukkan terdapat perbedaan antara perlakuan SS 0% (kontrol) dan perlakuan SS 5%, SS 10%, SS 15%, SS 20%, dan SS 25%. Terdapat pula perbedaan antara perlakuan SS 5% dan SS 15%, SS 5% dan SS 20%, SS 10% dan SS 15%, serta SS 15% dan SS 25% (Lampiran 4).

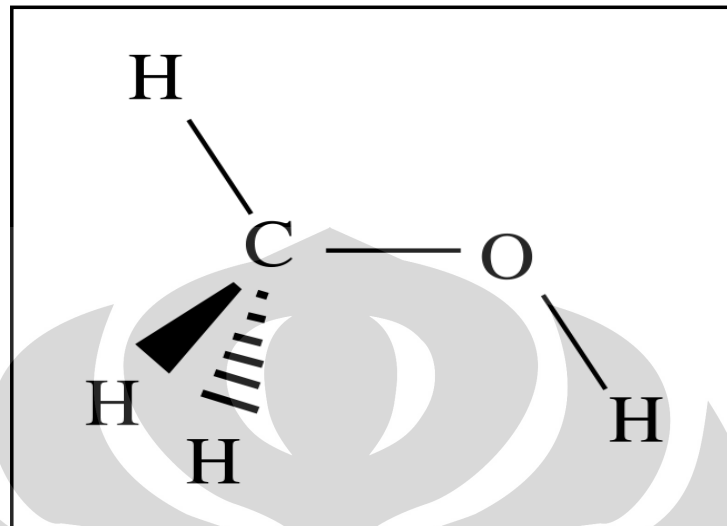
Nilai rata-rata persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tiap perlakuan adalah $56,57 \pm 3,95\%$ (SS 0%), $67,75 \pm 4,61\%$ (SS 5%), $73,09 \pm 3,82\%$ (SS 10%), $80,98 \pm 4,08\%$ (SS 15%), $77,70 \pm 4,24\%$ (SS 20%), dan $71,87 \pm 3,45\%$ (SS 25%) (Tabel 4.2). Data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.3. Berdasarkan data hasil penelitian, nilai rata-rata persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi lebih kecil dibandingkan dengan nilai persentase motilitas spermatozoa ikan gurami prakriopreservasi kecuali perlakuan SS 15% dan SS 20%. Jika dibandingkan dengan perlakuan SS 0% (kontrol), seluruh perlakuan SS 5%, SS 10%, SS 15%, SS 20%, dan SS 25% berbeda nyata (Gambar 4.7). Perlakuan pemberian berbagai konsentrasi susu skim yang dikombinasikan dengan metanol 10% menunjukkan peningkatan nilai persentase motilitas spermatozoa ikan gurami jika dibandingkan dengan kontrol. Menurut Muchlisin (2005:13), susu skim dan metanol merupakan kombinasi krioprotektan yang baik dalam kriopreservasi spermatozoa ikan.



Gambar 4.7. Diagram batang persentase rata-rata motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Penurunan nilai persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi dapat disebabkan oleh toksisitas metanol. Metanol (Gambar 4.8) bersifat toksik pada sel. Toksisitas metanol terjadi karena metabolisme metanol (Ikawati 2010: 2). Metabolisme metanol pada kriopreservasi dapat terjadi ketika proses ekuilibrisasi dan setelah *thawing*. Metabolisme metanol terjadi jika terdapat enzim katalase termasuk *alcohol dehydrogenase* (ADH). Menurut Nurachman (2001: 3), enzim alkohol dehidrogenase banyak terdapat di sitoplasma pada sel. Enzim tersebut juga dapat berada pada plasma semen. Enzim tersebut mampu bekerja pada suhu 30--40° C. Enzim tersebut mampu mengubah metanol menjadi formaldehida. Formaldehid selanjutnya akan diubah menjadi asam format dengan bantuan enzim *formaldehyde dehydrogenase*. Perubahan tersebut dapat terjadi dalam waktu yang singkat. Asam format berdampak negatif

terhadap sel karena bersifat racun dan merusak sel. Oleh karena itu, motilitas spermatozoa terganggu (Timbrell 2008: 385; Ikawati 2010: 2).



Gambar 4.8. Struktur molekul metanol
[Sumber: McGuigan 2003: 1.]

Persentase motilitas spermatozoa ikan gurami yang menurun juga disebabkan oleh laktenin yang terkandung pada susu. Laktenin adalah senyawa yang terkandung dalam susu. Laktenin bersifat racun bagi spermatozoa. Pemanasan pada susu skim bertujuan mengurangi atau menghilangkan efek racun yang disebabkan oleh laktenin. Susu skim yang digunakan dalam penelitian dipanaskan terlebih dahulu selama 1 menit pada suhu 87--97 °C. Hal tersebut berdasarkan metode Salisbury & VanDenmark (1985: 588). Proses pemanasan menyebabkan deaktivasi enzim yang terkandung di dalam susu. Salah satu enzim tersebut adalah enzim katalase yang mampu memetabolisme metanol. Terdeaktivasinya enzim tersebut membuat metanol tidak dapat berubah menjadi formaldehid sehingga mampu mengurangi toksisitas metanol (Ikawati 2010: 3).

Proses pemanasan susu skim yang dilakukan pada penelitian juga mampu mendenaturasi protein serum pada susu skim (Goff 1995a: 7). Proses denaturasi tersebut menghasilkan asam amino sistein yang memiliki gugus sistein hidroklorida (SH). Sistein mampu mengikat formaldehid hasil dari metabolisme metanol. Pengikatan formaldehid tersebut menyebabkan tidak terbentuknya asam format dari formaldehid dan membentuk senyawa yang cenderung lebih aman

bagi spermatozoa. Sistein juga mampu menetralsir laktenin yang terkandung dalam susu (Salisbury & VanDenmark 1985: 588).

Berdasarkan penelitian Thacker dan Almquist (1952: 174), susu skim yang dipanaskan menghasilkan nilai persentase motilitas spermatozoa pascakriopreservasi yang lebih tinggi (63%) dibandingkan dengan susu skim yang tidak dipanaskan terlebih dahulu (28%). Selain karena hal tersebut, pemanasan susu dapat memecah laktosa pada susu skim menjadi glukosa dan galaktosa (gula yang lebih sederhana) yang dapat dijadikan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Miller *dkk.* 1999: 43). Susu skim yang digunakan dalam penelitian adalah susu skim cair. Penggunaan susu skim cair lebih baik dibandingkan dengan susu skim bubuk yang diencerkan. Susu skim bubuk yang diencerkan dapat terkontaminasi bakteri dari pengencernya. Salisbury & VanDenmark menyatakan bahwa susu skim bubuk yang diencerkan memberikan nilai persentase fertilitas lebih rendah (67,3%) dibandingkan dengan susu skim cair (68,9%).

Susu skim digunakan dalam penelitian karena lebih baik dibandingkan dengan *whole milk*. Berdasarkan hasil penelitian Thacker & Almquist (1952: 174) pengamatan motilitas spermatozoa akan lebih sulit jika menggunakan *whole milk* karena jumlah *fat globule* yang terdapat pada *whole milk* terlalu banyak sehingga dapat menghalangi pengamatan pada mikroskop. Selain hal tersebut, *whole milk* akan menggumpal jika dicampur dengan sampel semen. Penggumpalan dapat dihindari dengan cara mengganti *whole milk* dengan susu rendah lemak, namun hal tersebut tetap tidak dapat menghindari sulitnya pengamatan motilitas spermatozoa pada mikroskop karena terhalang oleh *fat globule* (Thacker & Almquist 1952: 174--175).

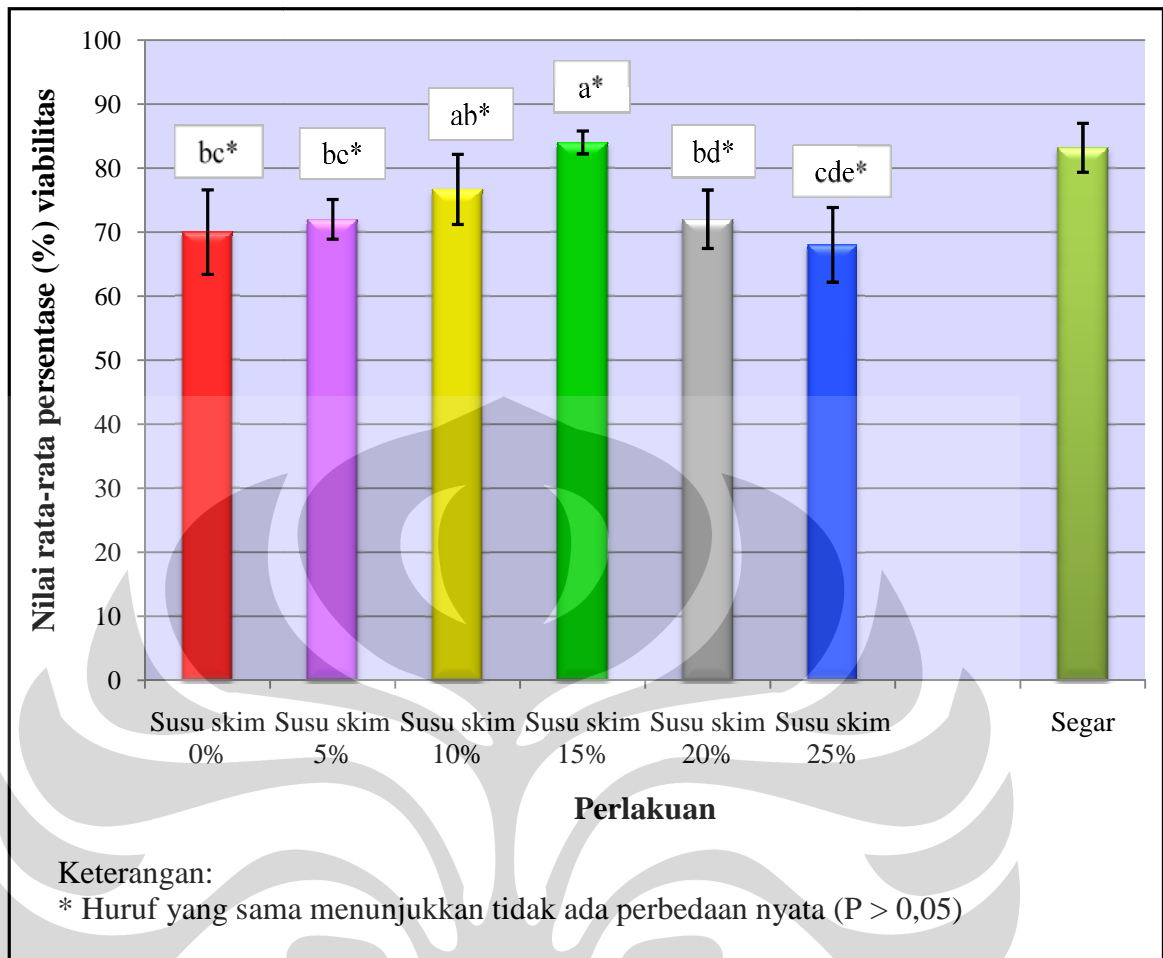
Perlakuan SS 15% menunjukkan nilai persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tertinggi. Oleh karena itu, susu skim 15% yang dikombinasikan dengan metanol 10% merupakan komposisi susu skim yang terbaik. Kombinasi tersebut merupakan campuran krioprotektan yang efektif untuk spermatozoa ikan gurami. Senyawa-senyawa yang merugikan bagi spermatozoa dapat diminimalisir dengan penggunaan kombinasi krioprotektan tersebut. Penambahan konsentrasi susu skim (SS 20% dan SS 25%) menurunkan

persentase spermatozoa. Penurunan persentase spermatozoa tersebut kemungkinan disebabkan oleh kombinasi konsentrasi susu skim dan metanol yang tidak tepat. Konsentrasi yang tepat akan memberikan perlindungan yang terbaik bagi spermatozoa ikan gurami.

4.2.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa Ikan Gurami Dua Hari Pascakriopreservasi

Hasil uji Analisis Variansi (ANAVA) faktor tunggal terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi menunjukkan bahwa pemberian berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) dalam larutan pengencer dengan metanol 10% memiliki nilai rata-rata persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang berbeda nyata ($P < 0,05$) (Lampiran 3). Hasil uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi menunjukkan terdapat perbedaan antara perlakuan SS 0% (kontrol) dan SS 15%, SS 5% dan SS 15%, SS 10% dan SS 25%, SS 15% dan SS 20%, serta SS 15% dan SS 25% (Lampiran 4).

Data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.3. Nilai rata-rata persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tiap perlakuan adalah $70 \pm 6,60\%$ (SS 0%), $72 \pm 3,10\%$ (SS 5%), $77 \pm 5,47\%$ (SS 10%), $84 \pm 1,79\%$ (SS 15%), $72 \pm 4,56\%$ (SS 20%), dan $68 \pm 5,83\%$ (SS 25%) (Tabel 4.2). Berdasarkan data hasil penelitian, nilai rata-rata persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi lebih kecil dibandingkan dengan nilai persentase motilitas spermatozoa ikan gurami prakriopreservasi kecuali perlakuan SS 15%. Jika dibandingkan dengan perlakuan SS 0% (kontrol), perlakuan SS 15% berbeda nyata (Gambar 4.9).



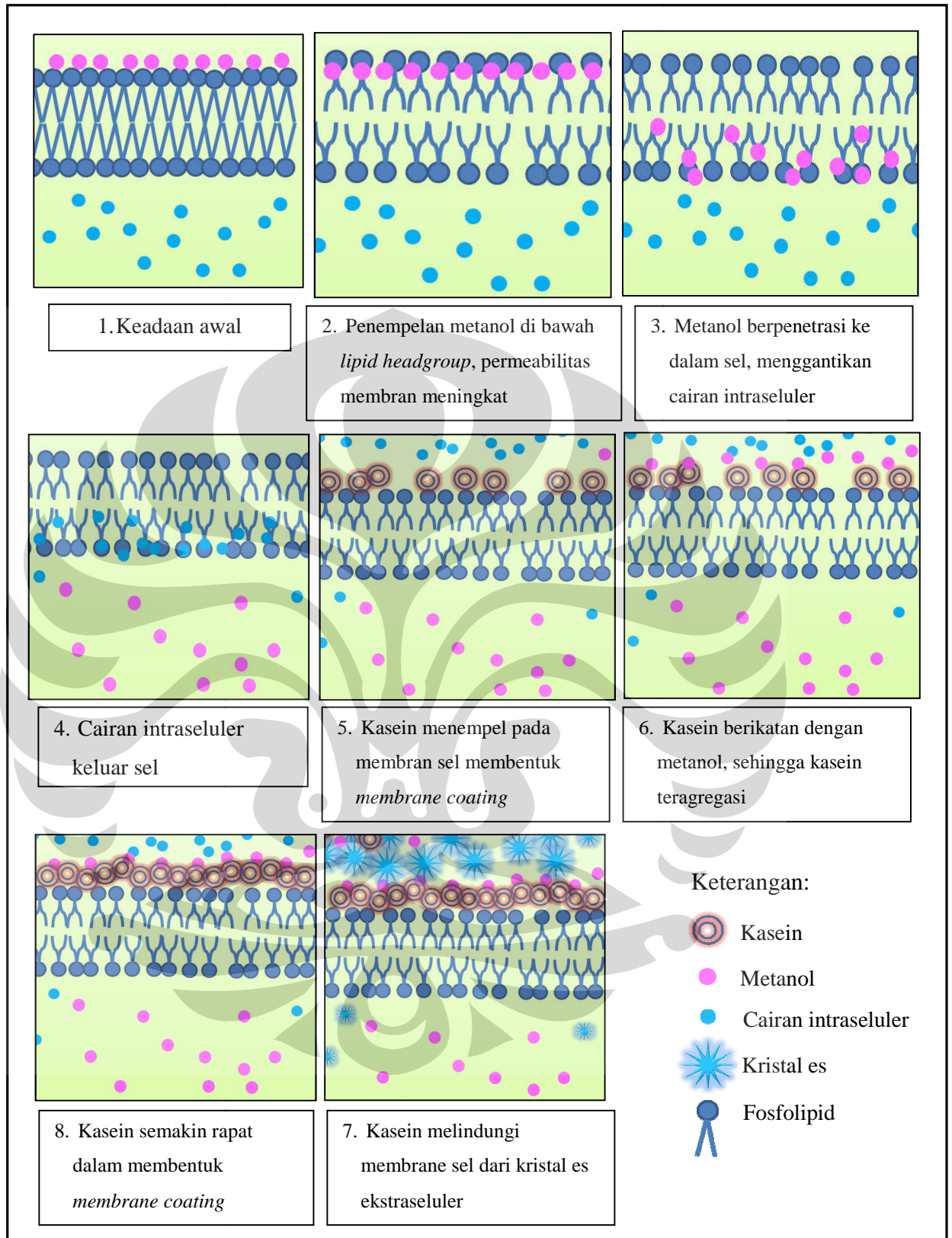
Gambar 4.9. Diagram batang persentase rata-rata viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Penurunan persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi dibandingkan dengan spermatozoa segar (prakriopreservasi) dapat disebabkan oleh *cryoinjury*. *Cryoinjury* yang dapat memengaruhi viabilitas spermatozoa adalah terbentuknya kristal es ekstraseluler dan intraseluler serta *cold shock*. Penurunan persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang dilakukan pada penelitian kemungkinan disebabkan oleh kristal es yang terbentuk. Hal tersebut berdasarkan pernyataan Li Jun *dkk.* (2006: 370) bahwa pembentukan kristal es merupakan penyebab utama kerusakan membran sel pada proses kriopreservasi. Kerusakan membran sel terjadi karena stres mekanik pada membran (Leung 1991: 237).

Menurut Harvey (1983: 315), kombinasi antara metanol sebagai krioprotektan intraseluler dan susu skim sebagai krioprotektan ekstraseluler

merupakan kombinasi krioprotektan yang baik. Hal tersebut memengaruhi viabilitas spermatozoa karena berkaitan dengan pertahanan membran sel spermatozoa. Kedua krioprotektan tersebut saling melengkapi dan membentuk perlindungan spermatozoa ikan gurami selama proses kriopreservasi. Metanol sebagai krioprotektan intraseluler berfungsi menurunkan titik beku dan menghambat pembentukan kristal es ekstraseluler. Oleh karena itu, susu skim sebagai krioprotektan ekstraseluler memiliki waktu yang cukup untuk membentuk perlindungan ekstraseluler (Leung 1991: 240). Kombinasi susu skim 15% dan metanol 10% merupakan kombinasi yang terbaik untuk melindungi spermatozoa sehingga menghasilkan nilai rata-rata persentase viabilitas yang tinggi ($84 \pm 1,79\%$).

Susu skim melindungi spermatozoa dengan cara *membrane coating*. Proses perlindungan susu skim dengan cara *membrane coating* tersebut diawali dengan pengikatan protein susu (terutama kasein) pada permukaan membran sel (Keenan *dkk.* 1970: 295). Protein kasein pada susu skim merupakan protein konjugat yang mudah berikatan dengan senyawa lain. Protein kasein akan teragregasi dan semakin rapat sehingga kuat untuk melindungi membran spermatozoa (Goff 1995a: 7). Protein tersebut mampu berikatan dengan molekul-molekul spesifik pada membran spermatozoa untuk membentuk lapisan perlindungan spermatozoa (*membrane coating*). Perlindungan dengan cara *membrane coating* tersebut dapat melindungi kerusakan membran sel dari kristal es ekstraseluler (Lahnsteiner *dkk.* 2004: 807; Li Jun *dkk.* 2006: 370). Skema perlindungan membran spermatozoa oleh metanol sebagai krioprotektan intraseluler dan susu skim (kasein) sebagai krioprotektan ekstraseluler dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 4.10. Mekanisme perlindungan membran sel oleh metanol dan kasein
[Sumber: modifikasi dari DPKCL 2000: 2.]

Nilai persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami pascakriopreservasi dapat menjadi rendah karena adanya *cold shock*. *Cold shock* atau kejutan dingin terjadi karena membran spermatozoa berubah dari fase cair menjadi padat. (Leung 1991: 236). Hal tersebut terjadi karena lingkungan spermatozoa mengalami perubahan suhu yang drastis. Membran spermatozoa akan mengalami kebocoran sehingga isi sel dapat keluar dari dalam sel. Hal tersebut disebabkan oleh membran sel mengalami kontraksi yang lebih besar dibandingkan isi sel (Arifiantini *dkk.* 2005: 367). Perubahan membran sel menjadi padat dan berkontraksi tersebut dapat dicegah dengan penggunaan metanol dalam penelitian.

Metanol digunakan pada penelitian karena metanol merupakan senyawa *enhancer*. Senyawa *enhancer* berfungsi meningkatkan permeabilitas membran sel. Penambahan senyawa *enhancer* dapat menyebabkan rigiditas membran menurun sehingga membran sel akan menjadi lebih lentur. Namun, penurunan rigiditas membran sel yang terlalu berlebihan juga dapat merusak membran sel. Penurunan rigiditas membran sel tersebut juga menyebabkan ruang antarmolekul membran akan meningkat sehingga sistem regulasi terganggu (Lee *dkk.* 2004: 6). Hal tersebut dapat diatasi dengan adanya kasein pada susu skim. Proses *membrane coating* dapat mengimbangi penurunan rigiditas akibat senyawa *enhancer*

Perlakuan SS 25% menunjukkan nilai persentase rata-rata viabilitas yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol (penggunaan susu skim dengan konsentrasi 0%). Nilai rata-rata persentase viabilitas tertinggi adalah perlakuan SS 15% ($84 \pm 1,79\%$). Susu skim 15% merupakan kadar susu skim yang terbaik untuk menghasilkan nilai persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami yang tinggi dua hari pascakriopreservasi. Penambahan konsentrasi susu skim di atas 15%, yaitu perlakuan SS 20% dan 25% mengurangi viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi. Nilai rata-rata persentase viabilitas pada perlakuan SS 20% dan SS 25% berturut-turut adalah $72 \pm 4,56\%$ dan $68 \pm 5,83\%$. Penurunan persentase viabilitas tersebut kemungkinan disebabkan perlindungan yang tidak maksimum terhadap spermatozoa karena kombinasi konsentrasi krioprotektan metanol dan susu skim yang tidak tepat. Krioprotektan metanol dan

susu skim bekerja saling melengkapi sehingga diperlukan kombinasi yang tepat antara kedua krioprotektan tersebut.

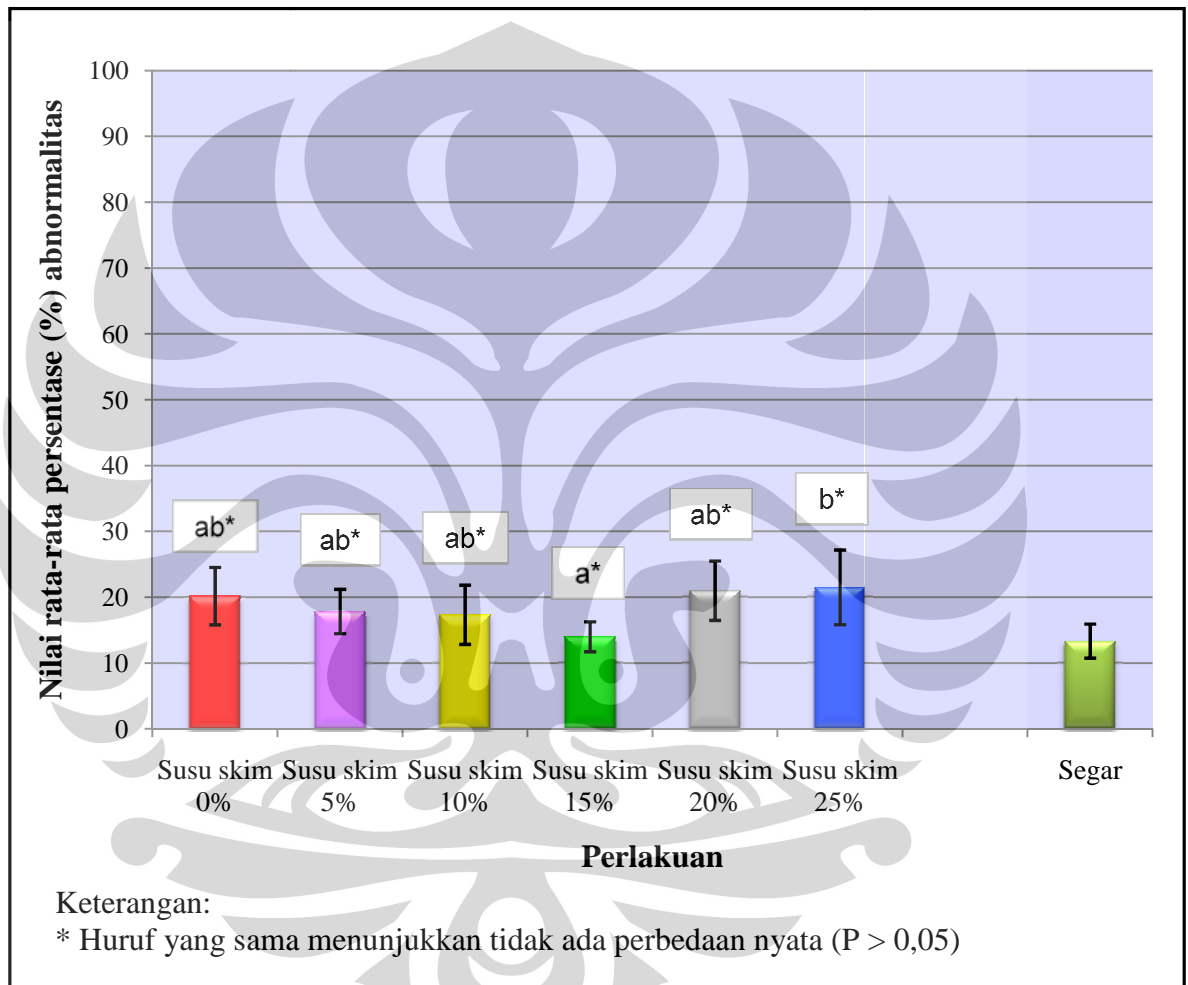
4.2.3 Persentase Abnormalitas Spermatozoa Ikan Gurami Dua Hari Pascakriopreservasi

Hasil uji Analisis Variansi (ANOVA) faktor tunggal terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi menunjukkan bahwa pemberian berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) dalam larutan pengencer dengan metanol 10% memiliki nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang berbeda nyata ($P < 0,05$) (Lampiran 3). Hasil uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi menunjukkan terdapat perbedaan antara perlakuan SS 15% dan SS 25% (Lampiran 4).

Nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tiap perlakuan adalah $20 \pm 4,36\%$ (SS 0%), $18 \pm 3,37\%$ (SS 5%), $17 \pm 4,50\%$ (SS 10%), $14 \pm 2,28\%$ (SS 15%), $21 \pm 4,52\%$ (SS 20%), dan $22 \pm 5,68\%$ (SS 25%) (Tabel 4.2). Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.3. Berdasarkan data hasil penelitian, nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi mengalami peningkatan dibandingkan dengan nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa prakriopreservasi.

Menurut Azizah & Arifiantini (2009: 64) kriteria spermatozoa yang baik adalah spermatozoa yang memiliki nilai rata-rata abnormalitas di bawah 30%. Perlakuan SS 15% menunjukkan nilai rata-rata abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi terendah yaitu sebesar $14 \pm 2,28\%$. Spermatozoa dengan nilai tersebut tergolong spermatozoa yang baik. Oleh karena itu, metanol 10% yang dikombinasikan dengan susu skim 15% merupakan kombinasi krioprotektan yang terbaik. Nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami pada perlakuan SS 5%, SS 10%, dan SS 15%, secara berturut-turut mengalami penurunan dari perlakuan SS 0% (kontrol). Nilai rata-rata persentase abnormalitas tersebut kembali naik pada perlakuan SS 20% dan SS

25%. Perlakuan SS 25% menunjukkan nilai rata-rata abnormalitas spermatozoa pascakriopreservasi tertinggi yaitu sebesar $21,5 \pm 5,68\%$ (Gambar 4.11). Penambahan konsentrasi susu skim di atas batas optimum diduga dapat meningkatkan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi.



Gambar 4.11. Diagram batang persentase rata-rata abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Bentuk abnormalitas pada spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi secara umum tidak jauh berbeda jika dibandingkan dengan bentuk abnormalitas spermatozoa dari semen segar ikan gurami. Abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang ditemukan pada

penelitian juga terdapat pada bagian kepala dan ekor (Gambar 4.12). Perbedaannya adalah abnormalitas pada spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi lebih banyak ditemukan pada ekor, yaitu ekor yang terputus dan melingkar. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Kyoung Ho Kang *dkk.* (2004: 1432) bahwa spermatozoa pascakriopreservasi mengalami peningkatan abnormalitas pada bagian ekor, yaitu ekor yang terputus dan melingkar.

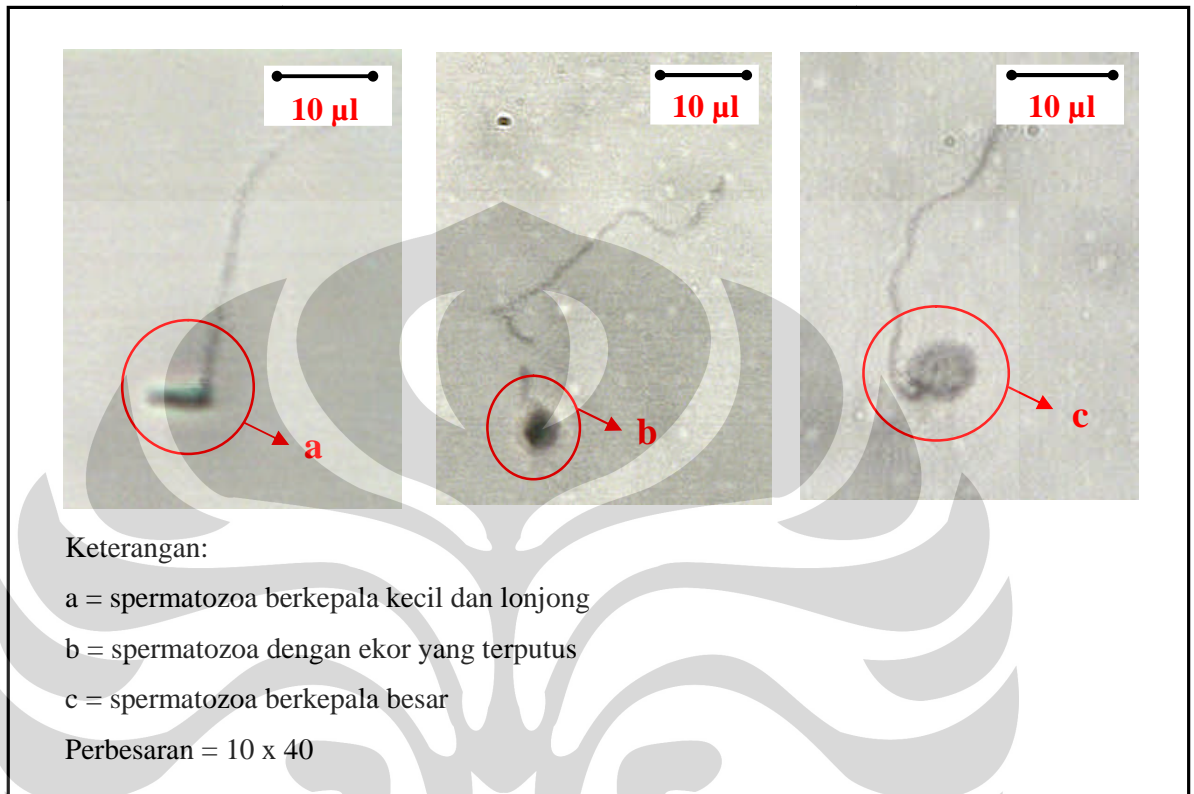
Abnormalitas pada bagian ekor spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi mayoritas ditandai dengan ekor yang terputus. Ekor spermatozoa merupakan bagian spermatozoa yang sangat rentan terhadap kerusakan karena bentuknya yang tipis dan memanjang. Selain ekor yang terputus, banyak pula dijumpai ekor yang melingkar pada pengamatan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi. Menurut Aditya (2008: 40--41), ekor spermatozoa yang melingkar dapat disebabkan oleh suhu lingkungan spermatozoa yang dingin pada proses kriopreservasi.

Abnormalitas spermatozoa dapat disebabkan oleh hal-hal yang terjadi pada proses kriopreservasi antara lain terbentuknya kristal es ekstraseluler. Selain itu, penanganan sampel spermatozoa selama pengamatan yang dilakukan juga dapat menyebabkan spermatozoa ikan gurami memiliki ekor terputus (Toelihere 1981: 114--115; Salisbury & VanDenmark 1985: 448).

Abnormalitas pada bagian kepala pada umumnya disebabkan perbedaan tekanan osmotik antara cairan intraseluler dan cairan ekstraseluler. Perbedaan tekanan osmotik dapat terjadi karena proses kriopreservasi (dehidrasi dan rehidrasi) yang tidak sempurna (Muchlisin 2005: 12). Oleh karena itu, kepala spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi terlihat membesar, mengkerut, bahkan lisis.

Abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi dapat diminimalisir dengan penambahan kombinasi krioprotektan intraseluler dan ekstraseluler. Kombinasi metanol sebagai krioprotektan intraseluler dan susu skim sebagai krioprotektan ekstraseluler mampu melindungi spermatozoa sehingga terhindar dari kerusakan terutama pada bagian kepala. Kasein pada susu skim melindungi spermatozoa dengan cara melapisi membran spermatozoa (*membrane coating*). Oleh karena itu, membran spermatozoa akan terhindar dari

kerusakan mekanik akibat kristal es ekstraseluler yang terbentuk (Leung 1991: 237; Li Jun *dkk.* 2006: 370).



Gambar 4.12. Spermatozoa abnormal ikan gurami
 [Sumber: dokumentasi pribadi.]

Menurut Muchlisin (2005: 13) kombinasi antara krioprotektan metanol 10% dan susu skim dapat diaplikasikan pada penelitian kriopreservasi spermatozoa ikan lain. Kombinasi krioprotektan tersebut mampu mempertahankan kualitas sel yang dikriopreservasi apabila dicampur pada kombinasi yang tepat. Kombinasi antara metanol 10% dan susu skim 15% menghasilkan nilai rata-rata persentase motilitas dan viabilitas tertinggi, serta nilai rata-rata persentase abnormalitas terendah. Kombinasi antara metanol 10% dan susu skim 15% menghasilkan nilai rata-rata persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi berturut-turut sebesar $80,98 \pm 4,08\%$, $84 \pm 1,79\%$, dan $14 \pm 2,28\%$. Kombinasi tersebut

merupakan kombinasi yang terbaik untuk kriopreservasi spermatozoa ikan gurami selama dua hari.

Tabel 4.2. Data persentase rata-rata \pm standar deviasi motilitas, viabilitas, serta abnormalitas spermatozoa segar dan spermatozoa pascakriopreservasi pada ikan gurami

Tahap kriopreservasi	Perlakuan	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	Abnormalitas (%)
Prakriopreservasi (segar)	-	75,89 \pm 3,65	83 \pm 3,82	13 \pm 2,58
Pascakriopreservasi	Susu skim 0%	56,57 \pm 3,95	70 \pm 6,60	20 \pm 4,36
	Susu skim 5%	67,75 \pm 4,61	72 \pm 3,10	18 \pm 3,37
	Susu skim 10%	73,09 \pm 3,82	77 \pm 5,47	17 \pm 4,50
	Susu skim 15%	80,98 \pm 4,08	84 \pm 1,79	14 \pm 2,28
	Susu skim 20%	77,70 \pm 4,24	72 \pm 4,56	21 \pm 4,52
	Susu skim 25%	71,87 \pm 3,45	68 \pm 5,83	22 \pm 5,68

Tabel 4.3. Data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

n	Motilitas (%)										Viabilitas (%)										Abnormalitas (%)									
	Susu skim										Susu skim										Susu skim									
	0%	5%	10%	15%	20%	25%	0%	5%	10%	15%	20%	25%	0%	5%	10%	15%	20%	25%	0%	5%	10%	15%	20%	25%						
1	52,17	69,57	77,14	79,55	75,47	69,91	66	73	81	85	65	58	22	21	15	17	25	31												
2	58,13	63,93	71,00	83,33	80,88	66,66	65	75	73	84	72	65	21	21	19	15	24	17												
3	51,16	60,78	67,35	73,77	74,60	73,68	63	69	69	81	77	71	27	20	25	12	16	16												
4	59,52	72,09	72,54	80,60	71,93	72,73	70	70	80	86	77	68	20	13	12	12	15	18												
5	60,66	67,80	77,46	85,07	82,19	76,81	78	76	83	83	70	72	16	15	15	12	21	23												
6	57,77	72,31	73,02	83,56	81,15	71,42	78	69	74	85	71	74	15	17	18	16	25	24												
\bar{X}	56,57	67,75	73,09	80,98	77,70	71,87	70	72	76	84	72	68	20	18	17	14	21	22												
SD	3,95	4,61	3,82	4,08	4,24	3,45	6,60	3,10	5,47	1,79	4,56	5,83	4,36	3,37	4,50	2,28	4,52	5,68												

Keterangan:

n = pengulangan
SD = standar deviasi
 \bar{X} = nilai rata-rata

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kombinasi krioprotektan metanol 10% dengan susu skim 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% mampu meningkatkan motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi jika dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan susu skim).
2. Kombinasi krioprotektan metanol 10% dengan susu skim 5%, 10%, 15%, dan 20% mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa, namun penambahan susu skim 25% menurunkan viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi jika dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan susu skim).
3. Kombinasi krioprotektan metanol 10% dengan susu skim 5%, 10%, dan 15% mampu menurunkan persentase abnormalitas spermatozoa, namun penambahan susu skim 20% dan 25% meningkatkan persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi jika dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan susu skim).
4. Kombinasi susu skim 15% dengan metanol 10% adalah kombinasi krioprotektan yang terbaik karena menunjukkan nilai rata-rata tertinggi (terbaik) pada persentase motilitas ($80,98 \pm 4,08\%$) dan viabilitas ($84 \pm 1,79\%$), serta nilai rata-rata terendah (terbaik) pada persentase abnormalitas ($14 \pm 2,28\%$) spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan fertilisasi spermatozoa yang telah dikriopreservasi menggunakan kombinasi metanol konsentrasi 10% dengan susu skim konsentrasi 15%.

DAFTAR ACUAN

- Aditya. 2008. Kajian morfologi dan morfometri spermatozoa anoa (*Bubalus sp.*) dengan pewarnaan Williams dan Eosin-nigrosin. Skripsi S1 - Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor: vii + 65 hlm.
- Akçay, E., Y. Bozkurt, S. Secer & N. Tekun. 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkey Journal Veterinary Animal Science* **28**: 837--843.
- Alavi, S.M.H. & J. Cosson. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* **30**: 1--14.
- Azizah & R.I Arifiantini. 2009. Kualitas semen beku kuda pada pengencer susu skim dengan konsentrasi gliserol yang berbeda. *Jurnal Veteriner* **10**(2): 63--70.
- 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 Peternakan dan Veteriner*: 366--376.
- BBPBAT (= Balai Budidaya dan Pengembangan Biota Air Tawar), 2008. Kriopreservasi: Suatu strategi menuju perikanan berkelanjutan. 13 Agustus: 1 hlm. <http://www.bbpbat.net/infotek/artikel-pilihan/65-artikel-pilihan/84-kriopreservasi-suatu-strategi-menuju-perikanan-berkelanjutan>, 19 Agustus 2008, pk. 17.25.
- Bearden, H.J., J.W. Fuquay & S.T. Willard. 2004. *Applied animal reproduction*. 6th ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey: xvi + 427 hlm.
- Billard, R., J. Cosson, G. Percheç & O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* **129**: 95--112.
- Boediono, A. 2007. Kriopreservasi sperma, oosit, dan embrio. 27 Januari: 27 hlm. <http://ksuheimi.blogspot.com/2008/07/kriopreservasi-sperma-oosit-dan-embrio.html>. 17 Januari 2009, pk. 21.10.
- Bozkurt, Y., E. Akçay, N. Tekin & S. Secer. 2005. Effect of freezing techniques, extenders, and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah* **57**: 1--6.

- Cabrita, E., L. Anel & M. P. Herraéz. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology* **56**: 623--635.
- Cabrita, E., V. Robles, S. Cunado, J. C. Wallace, C. Sarasquete & M. P. Herraéz. 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* **50**: 273--284.
- Changjiang Huang, Qiaoxiang Dong, R.B. Walter & T.R. Tiersch. 2004. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish internal fertilization. *Cryobiology* **48**: 295--308.
- Christensen, J. M. & 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.
- Dada, R., N. P. Gupta & K. Kucheria. 2001. Deterioration of sperm morphology in men exposed to high temperature. *Journal of Anatomy* **50**(2): 107--111.
- DKP (= Dinas Kelautan dan Perikanan). 2008. Konservasi sumberdaya ikan di Indonesia. Direktorat Konservasi dan Taman Nasional Laut, Jakarta: ix + 66 hlm.
- DPKCL (= Department of Pharmacy King's College London). 2000. Research highlight: Mechanism of action of membrane penetration enhancers. (?): 3 hlm.
https://www.kcl.ac.uk/kis/schools/life_sciences/health/pharmacy/resgrps/compps/ReasearchHighlights.htm, 26 April 2010, pk. 21.09.
- Draper, B., J. Stout, R. Hernandez & C. Moens. 2008. *A high-throughput sperm freezing protocol for zebrafish*. Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle: 7 hlm.
- ERFP (= European Regional Focal Point). 2004. *Guidelines for the Constitution of National Cryopreservation Programmes for Farm Animals*. Publication No. 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources, Paris: 55 hlm.

- Fujaya, Y. 2002. *Fisiologi ikan: Dasar pengembangan teknologi perikanan*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanudin, Makassar: vii + 204 hlm.
- Gazali, M. & S. N. Tambing. 2001. Kriopreservasi sel spermatozoa. *Hayati* **9**(1): 27--32.
- Ginzburg, A.S. 1972. *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem: 366 hlm.
- Goff, D. 1995a. Casein micelle structure. (?): 2 hlm.
<http://www.foodsci.uoguelph.ca/deicon/casein.html>, 8 April 2009, pk. 16.28.
- Goff, D. 1995b. Dairy chemistry and physics. (?): 17 hlm.
<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>, 8 April 2009, pk. 16.24.
- Hanafiah, K.A. 2004. *Rancangan percobaan: Teori dan aplikasi*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta: xiv + 186 hlm.
- Harvey, B. & W. S. Hoar. 1979. *The Theory and Practice of Induced Breeding in Fish*. IDRC Publication, Ottawa: 48 hlm.
- Harvey, B., N.R. Kelley & M.J. Ashwood-Smith. 1982. Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol. *Canada Journal Zoology* **60**: 1867--1870.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture* **32**: 313--320.
- Hidayaturrahmah. 2007. Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L) pada beberapa konsentrasi larutan fruktosa. *Bioscientiae* **4**(1): 9--18.
- Horvath, A. & B. Urbanyi. 2000. The effect of cryoprotectant on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Research* **31**: 317--324.
- Horvath, A., E. Miskolczi & B. Urbanyi. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources* **16**: 457--460.
- ITIS (=Integrated Taxonomic Information System). 2010. *Osphronemus goramy* Lacepede, 1801. 17 Januari: 2 hlm.

- http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=638762. 18 Januari 2010, pk. 12.54.
- Ikawati, Z. 2010. Metanol. 23 April: 24 hlm. <http://zulliesikawati.wordpress.com>. 24 April 2010, pk. 12.48.
- Jodun, W. A., K. King & P. Farrell. 2006. Methanol and egg yolk as cryoprotectants for Atlantic Salmon spermatozoa. *North American Journal of Aquaculture* **69**: 36--40.
- Keenan, T. W., D. E. Olson & H. H. Mollenhauer. 1970. Origin of the milk fat globule membrane. *Journal of Dairy Science* **54**(3): 295--299.
- Kuo-Chun Liu, Ta-Ching Chou & Hung-Du Lin. 1993. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. *Aquatic Living Resources* **6**: 63--66.
- Kusuda, S., N. Koide, H. Kawamura, T. Teranishi, E. Yamaha & K. Arai. 2004. Cryopreservation of Sakhalin Taimen *Hucho perryi* spermatozoa: Effect of cryoprotectants on post-thaw fertility. *Suisanzoshoku* **52**: 171--175.
- Kyoung Ho Kang, Kang He Kho, Zong Tao Chen, Jae Min Kim, Young Hun Kim & Zhi Feng Zhang. 2004. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunter, 1877) sperm. *Aquaculture Research* **35**: 1429--1433.
- Lahnsteiner, F., N. Mansour & B. Berger. 2004. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* **62**: 801--808.
- Lee, B.W., R. Faller, A.K.Sum, I. Vattulainen, M. Patra & M. Karttunen. 2004. Structural effects of small molecules of phospholipids bilayer investigated by molecular simulations. *Biophysical Journal* **83**: 1--8.
- Li Jun, Liu Qinghua & Zhang Shicui. 2006. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *Chinese journal of oceanology and limnology* **24**(4): 370--377.
- Leung, L. K. P. 1991. Principal of biological cryopreservation. *Dalam*. Jamieson, B.G.M. Jamieson. 1991. *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge: xiv + 319 hlm.

- Leung, L.K.P. & B. G. M. Jamieson. 1991. Live preservation of fish gametes.
Dalam: B.G.M. Jamieson. 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge: xiv + 319 hlm.
- McGuigan, B. 2003. What is methanol? 3 April: 2 hlm.
<http://www.wisegeek.com/what-is-methanol.htm>. 15 Januari 2009, pk. 20.40.
- Melo, F. C. S. A. & H. P. Godinho. 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction* **3**: 380--385.
- MES (= Medical Electronic System Ltd.). 2006. SQA vs. microscope comparison protocol for human semen samples. 15 February: 7 hlm. <http://www.mes-ltd.com>. 29 Agustus 2009, pk. 11.29.
- Miller, G., J. Jarvis & L. McBean. 1999. Nutritional properties of milk powders.
Handbook of Dairy Foods and Nutrition **2**: 40--49.
- Moeloe, N. 1983. Analisis semen manusia. *Cermin Dunia Kedokteran* **30**: 51--58.
- Morita, M., M. Fujinoki & M. Okuno. 2005. K⁺-independent initiation of motility in chum salmon sperm treated with an organic alcohol, glycerol. *The Journal of Experimental Biology* **208**: 4549--4556.
- Muchlisin, Z. A., R. Hashim & 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.
- Muchlisin, Z. A. 2005. Review: Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas* **6**(1): 12--15.
- Muchlisin, Z. A. & M. N. S. Azizah. 2009. Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. *Cryobiology* **58**(2): 166--169.
- Mukhlis. 2009. Hipofisa dan Ovaprim. 26 Maret: 13 hlm.
<http://mukhlasmuthiullah.blogspot.com/2009/03/hipofisa-dan-ovaprim.html>. 26 Februari 2009, pk. 07.33.

- Nai-Hsien Chao, N. H., W. C. Nai-Hsien Chao, K. C. Liu & I. C. Liao. 1987. The properties of tilapia sperm and it's cryopreservation. *Journal Fish Biodiversity* **30**: 107--118.
- Nurachman, Z. 2001. Formalin di makanan tak berbahaya. 23 Januari: 6 hlm. <http://groups.yahoo.com/group/biotek/message/4068>. 8 Mei 2010, pk. 10.29.
- Oberweis, E. 2001. Skim milk. 23 Februari: 2 hlm. <http://en.allexperts.com/q/Dairy-Foods-2479.html>. 15 Januari 2009, pk. 20.30.
- Oteme, Z. J., J. N. Rodriguez, C. K. Kouassi, S. Hem & F. Agnese. 1996. Testicular structure, spermatogenesis, and sperm cryopreservation in the African clariid catfish *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840). *Aquaculture Research* **27**: 805--813.
- Perchec, G., C. Jeulin, J. Cosson, F. Andre & R. Billard. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* **108**: 747--753.
- Praseno, O., M.F. Sukadi & L. Dharma. 1993. Pembenuhan ikan air tawar potensial di Indonesia. *Dalam: Hardjamulia, A. & Widiati (eds.). 1996. Prosiding simposium perikanan Indonesia I. Buku II. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, Jakarta: 268--270.*
- Riley, K. L., C. G. Holladay, E. J. Chesney, & T. R. Tiersch. 2004. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture* **238**: 183--194.
- 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. Review article: The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**: 1--28.
- Salisbury, G.W. & N.L. VanDemark. 1985. *Fisiologi reproduksi dan inseminasi buatan pada sapi*. Terj. dari *Reproductive physiology and induced*

- breeding*, oleh Djanuar, R. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta: xv + 869 hlm.
- Shuyang He, S. & L. C. Woods. 2003. The effect of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on Striped Bass *Morone saxatilis* sperm motility. *Journal of The World Aquaculture Society* **34**: 255--265.
- Simione, F. P. 1998. *Cryopreservation manual*. Nalge Nunc International Corp., Los Angeles: 8 hlm.
- Singsee, S., U. Imsilp, P. Pewanane & N. Sukumasavin. 2005. *Preservation of Cirrhinus microlepis*. Proceedings of 7th Technical Symposium on Mekong Fisheries, Thailand, 15--17 November, 2005. MRC Fisheries Programme, Ubon Ratchathani: 205--211.
- Sitanggang, M. & B. Sarwono. 2006. *Budidaya gurami*. Penerbit Swadaya, Jakarta: viii + 72 hlm.
- Smith, E. 2003. What is skim milk?. 7 September: 3 hlm.
<http://www.wisegeek.com/what-is-methanol.htm>. 17 Januari 2009, pk. 21.00.
- Sukumasavin, N. 2008. *Advanced freshwater aquaculture: Fish reproduction*. Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Thailand: 133--159 hlm.
- Sunarma, A., D. W. Hastuti & Y. Sistina. 2007a. Penggunaan ekstender madu yang dikombinasikan dengan krioprotektan berbeda pada pengawetan sperma Ikan nilam (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842). Konferensi Aquaculture Indonesia 2007, Surabaya, 5--7 Juni, 2007. Masyarakat Akuakultur Indonesia, Surabaya: 1--9.
- Suanarma, A., Subandri & P. Sumedi. 2007b. Hasil awal pengembangan metode *induced-breeding* dan perkembangan embrio ikan gurami. Konferensi Sains Kelautan dan Perikanan 2007, Bogor, 17--18 Juli, 2007. Masyarakat Sains Kelautan dan Perikanan, Sukabumi: 1--9.
- Sunarya, U. P. 2007. *Seri agribisnis gurami soang*. Penebar Swadaya, Depok: 131 hlm.

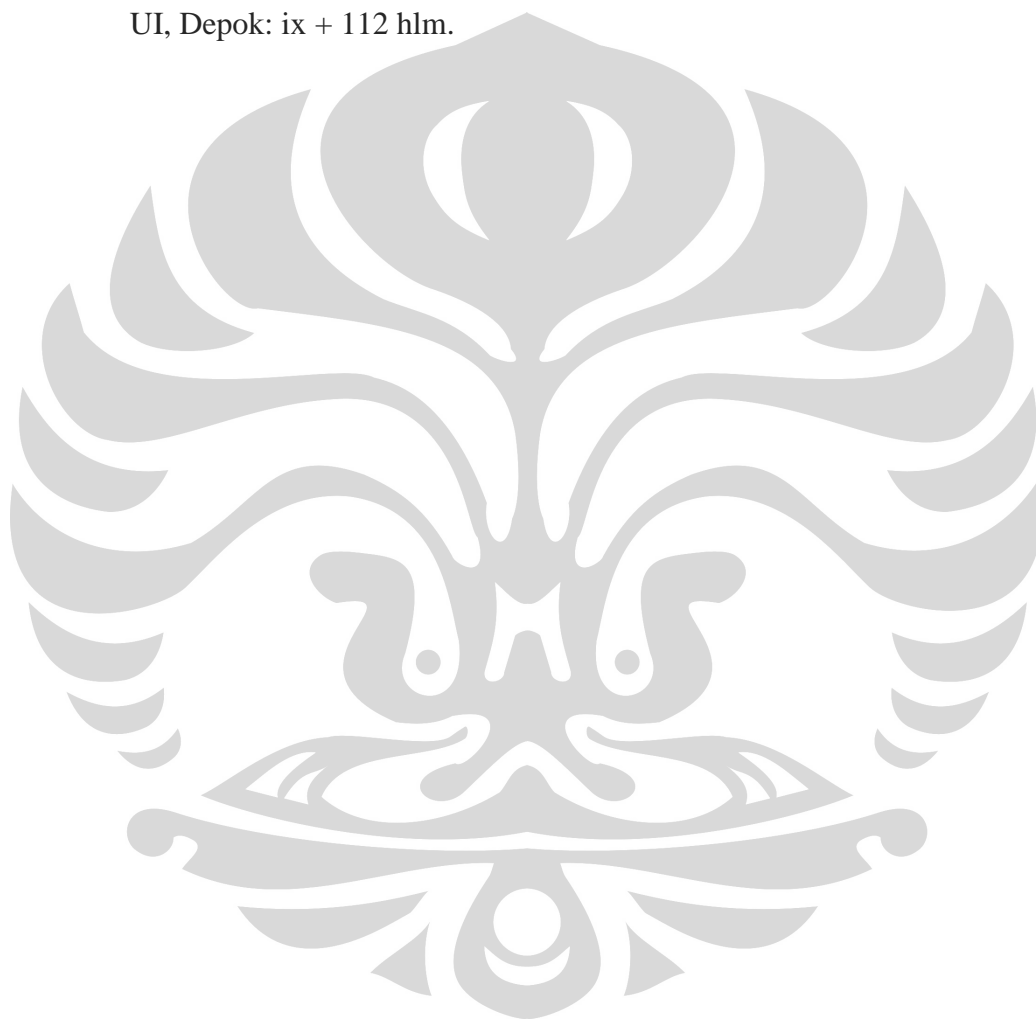
- Suquet, M., C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson & R. Billiard. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* **31**(3): 231--243.
- Tambing, S.N. 2005. Penyimpanan pembawa materi genetik ternak dengan teknik kriopreservasi. 16 januari: 7 hlm.
http://sulse.litbang.deptan.go.id/index.php?option=com_content&task=category§ionid=23&id. 17 Januari 2009, pk. 21.11.
- Thacker, D. L. & J. O. Almquist. 1952. Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. *Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experimental Station* **1**(1756): 173--179.
- The Fertility Institutes. 2008. Sperm evaluation and testing. 10 September: 5 hlm.
http://www.fertility-docs.com/sperm_eval_tests.phtml. 24 April 2009, pk. 12.03.
- Timbrell, J.A. 2008. *Principles of biochemical toxicology*. 4th ed. Informa Health Care, Inc. New York: 453 hlm.
- Toelihere, M.R. 1981. *Fisiologi reproduksi pada ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung: 327 hlm.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi buatan pada ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung: 292 hlm.
- Varnam, A.H. & J.P. Sutherland. 2001. *Milk and milk products: Technology, chemistry, and microbiology*. Springer, London: 451 hlm.
- WHO (= World Health Organization). 1988. *Penuntun laboratorium WHO untuk pemeriksaan semen manusia dan interaksi semen-getah serviks*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: xiv + 78 hlm.
- Wolfe, S. L. 1995. *Introduction to cell and molecular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xvii + 820 hlm.
- Yanong, R. P. E., C. Martinez & C. A. Watson. 2009. Use of ovaprim in ornamental fish aquaculture. *Institute of Food and Agricultural Science University of Florida* **161**: 1--8.

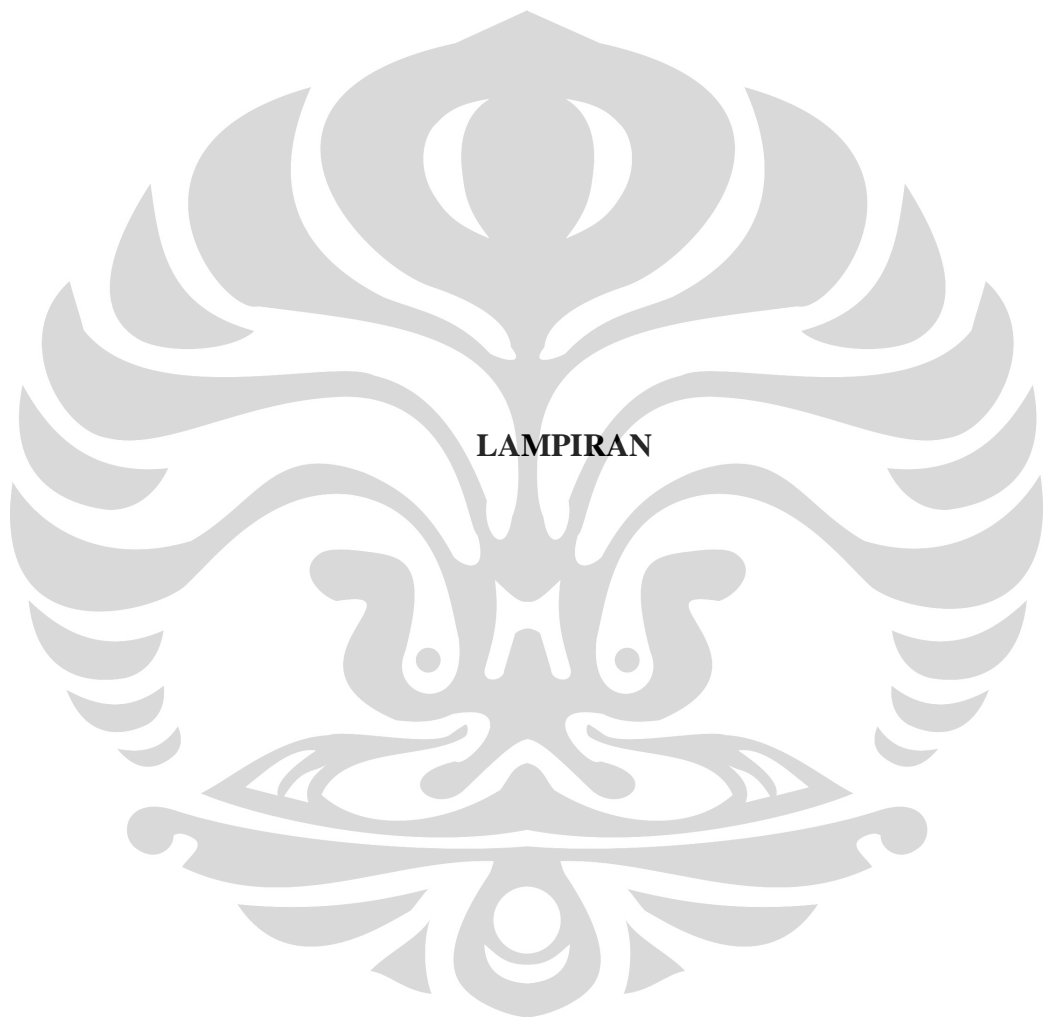
Yulnawati & M. A. Setiadi. 2005. Motilitas dan keutuhan membrane plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4° C.

Media Kedokteran Hewan **21**(3): 100--104.

Zar, J.H. 1974. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc., London: xiv + 620 hlm.

Zuraida. 2005. Pengaruh kombinasi 5% metanol dengan berbagai konsentrasi susu skim terhadap kualitas spermatozoa ikan tawes, *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850) satu hari pascakriopreservasi. Skripsi S1 - Biologi FMIPA UI, Depok: ix + 112 hlm.





Lampiran 1

Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Tujuan : untuk mengetahui normalitas data

Hipotesis :

$H_0(1)$: data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

$H_a(1)$: data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal

$H_0(2)$: data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

$H_a(2)$: data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal

$H_0(3)$: data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

$H_a(3)$: data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal

Keterangan:

Nilai yang digunakan adalah $db = n = 36$, $P =$ probabilitas

Kriteria keputusan:

1. Jika $P > 0,05$ maka H_0 diterima
2. Jika $P < 0,05$ maka H_0 ditolak

Hasil perhitungan:

- A. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Motilitas	db	α	P
	36	0,05	0,126

$P = 0,126 \rightarrow P > 0,05$, maka H_0 diterima

- B. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Viabilitas	db	α	P
	36	0,05	0,340

$P = 0,340 \rightarrow P > 0,05$, maka H_0 diterima

- C. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Abnormalitas	db	α	P
	36	0,05	0,088

$P = 0,088 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 diterima

Kesimpulan:

1. Data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi berdistribusi normal
2. Data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi berdistribusi normal
3. Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

Lampiran 2

Uji homogenitas Levene terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data

Hipotesis :

$H_0(1)$: data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

$H_a(1)$: data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tidak bervariasi homogen

$H_0(2)$: data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

$H_a(2)$: data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tidak bervariasi homogen

$H_0(3)$: data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

$H_a(3)$: data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi tidak bervariasi homogen

Keterangan:

P = probabilitas

Kriteria keputusan:

1. Jika $P > 0,05$ maka H_0 diterima
2. Jika $P < 0,05$ maka H_0 ditolak

Hasil perhitungan:

- A. Uji homogenitas Levene terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Test of Homogeneity of Variances			
Motilitas			
Levene Statistic	df1	df2	P
0,294	5	30	0,912

$P = 0,912$

$P < 0,05$, maka H_0 diterima

- B. Uji homogenitas Levene terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Test of Homogeneity of Variances			
Viabilitas			
Levene Statistic	df1	df2	P
2,261	5	30	0,074

$P = 0,074$

$P > 0,05$, maka H_0 diterima

- C. Uji homogenitas Levene terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Test of Homogeneity of Variances			
Abnormalitas			
Levene Statistic	df1	df2	P
0,888	5	30	0,501

$$P = 0,501$$

$P < 0,05$, maka H_0 diterima

Kesimpulan:

1. Data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi bervariasi homogen
2. Data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi bervariasi homogen
3. Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

Keterangan:

Data memenuhi syarat normalitas dan homogenitas. Oleh karena itu, pengujian dilanjutkan dengan uji parametrik Analisis Varians (ANAVA).

Lampiran 3

Uji Analisis Varians (ANAVA) faktor tunggal terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Tujuan : untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nilai rata-rata data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%)

Hipotesis :

$H_0(1)$: nilai rata-rata data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) tidak berbeda nyata

$H_a(1)$: nilai rata-rata data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) berbeda nyata

$H_0(2)$: nilai rata-rata data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) tidak berbeda nyata

$H_a(2)$: nilai rata-rata data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) berbeda nyata

$H_0(3)$: nilai rata-rata data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) tidak berbeda nyata

$H_a(3)$: nilai rata-rata data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) berbeda nyata

Keterangan:

P = probabilitas

Kriteria keputusan:

1. Jika $P > 0,05$ maka H_0 diterima
2. Jika $P < 0,05$ maka H_0 ditolak

Hasil perhitungan:

- A. Uji Analisis Varians (ANOVA) faktor tunggal terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Motilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P
Between Groups	2207,152	5	441,430	27,031	0,000
Within Groups	489,911	30	16,330		
Total	2697,062	35			

$P = 0,000$

$P < 0,05$, maka H_0 ditolak

- B. Uji Analisis Varians (ANOVA) faktor tunggal terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P
Between Groups	1000,889	5	200,178	8,514	0,000
Within Groups	705,333	30	23,511		
Total	1706,222	35			

$P = 0,000$

$P < 0,05$, maka H_0 ditolak

C. Uji Analisis Varians (ANAVA) faktor tunggal terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Abnormalitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P
Between Groups	239,806	5	47,961	2,652	0,042
Within Groups	542,500	30	18,083		
Total	782,306	35			

$P = 0,042$

$P < 0,05$, maka H_0 ditolak

Kesimpulan:

1. Berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) memiliki nilai rata-rata data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang berbeda nyata
2. Berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) memiliki nilai rata-rata data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang berbeda nyata
3. Berbagai konsentrasi susu skim (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) memiliki nilai rata-rata data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi yang berbeda nyata

Lampiran 4

Uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

- Tujuan : untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap data persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi
- Hipotesis :
- H₀(1) : tidak ada perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi
 - H_a(1) : ada perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi
 - H₀(2) : tidak ada perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi
 - H_a(2) : ada perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi
 - H₀(3) : tidak ada perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi
 - H_a(3) : ada perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

Keterangan:

P = probabilitas

Kriteria keputusan:

1. Jika $P > 0,05$ maka H_0 diterima
2. Jika $P < 0,05$ maka H_0 ditolak

Hasil perhitungan:

A. Uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

P							α
Susu skim 0%							0,05
Susu skim 5%	0,001*						
Susu skim 10%	0,000*	0,230					
Susu skim 15%	0,000*	0,000*	0,022*				
Susu skim 20%	0,000*	0,002*	0,377	0,724			
Susu skim 25%	0,000*	0,501	0,995	0,006*	0,156		
	Susu skim 0%	Susu skim 5%	Susu skim 10%	Susu skim 15%	Susu skim 20%	Susu skim 25%	

B. Uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

P							α
Susu skim 0%							0,05
Susu skim 5%	0,979						
Susu skim 10%	0,195	0,563					
Susu skim 15%	0,000*	0,002*	0,124				
Susu skim 20%	0,979	1,000	0,563	0,002*			
Susu skim 25%	0,979	0,170	0,044*	0,000*	0,710		
	Susu skim 0%	Susu skim 5%	Susu skim 10%	Susu skim 15%	Susu skim 20%	Susu skim 25%	

C. Uji perbandingan berganda Tukey terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

	P						α
Susu skim 0%							0,05
Susu skim 5%	0,930						
Susu skim 10%	0,855	1,000					
Susu skim 15%	0,153	0,629	0,751				
Susu skim 20%	0,999	0,788	0,671	0,076			
Susu skim 25%	0,994	0,671	0,544	0,049*	1,000		
	Susu skim 0%	Susu skim 5%	Susu skim 10%	Susu skim 15%	Susu skim 20%	Susu skim 25%	

Keterangan:

* = berbeda nyata ($P < 0,05$)

Kesimpulan:

1. Terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 5%, susu skim konsentrasi 0% dengan 10%, susu skim konsentrasi 0% dengan 15%, susu skim konsentrasi 0% dengan 20%, susu skim konsentrasi 0% dengan 25%, susu skim konsentrasi 5% dengan 15%, susu skim konsentrasi 5% dengan 20%, susu skim konsentrasi 10% dengan 15%, dan susu skim konsentrasi 15% dengan 25% terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi
2. Terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 15%, susu skim konsentrasi 5% dengan 15%, susu skim konsentrasi 10% dengan 25%, susu skim konsentrasi 15% dengan 20%, dan susu skim konsentrasi 15% dengan 25% terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

3. Terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan susu skim konsentrasi 15% dengan 25% terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan gurami dua hari pascakriopreservasi

