



UNIVERSITAS INDONESIA

**FERTILISASI SPERMATOZOA IKAN TAWES
(*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) SATU HARI
PASCAKRIOPRESERVASI MENGGUNAKAN CAMPURAN
METANOL DAN SUSU SKIM SEBAGAI KRIOPROTEKTAN**

SKRIPSI

**INDAH PRABAWATI UTAMI
0606069861**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
DESEMBER 2010**

UNIVERSITAS INDONESIA

**FERTILISASI SPERMATOZOA IKAN TAWES
(*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) SATU HARI
PASCAKRIOPRESERVASI MENGGUNAKAN CAMPURAN
METANOL DAN SUSU SKIM SEBAGAI KRIOPROTEKTAN**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**INDAH PRABAWATI UTAMI
0606069861**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
DESEMBER 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 : Indah Prabawati Utami

NPM : 0606069861

Tanda Tangan :

Tanggal : 15 Desember 2010



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Indah Prabawati Utami
NPM : 0606069861
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Fertilisasi Spermatozoa Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) Satu Hari Pascakriopreservasi Menggunakan Campuran Metanol dan Susu Skim sebagai Krioprotektan

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 : Dr. Abinawanto (.....)

Penguji I : Dr. Dadang Kusmana (.....)

Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 15 Desember 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, curahan kasih sayang, dan petunjuk selama penelitian dan penyusunan skripsi ini. Shalawat dan salam penulis sampaikan kepada junjung kita, Rasulullah SAW, sang penyelamat dan pemberi petunjuk bagi kemaslahatan seluruh umat. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada orang-orang yang telah banyak berjasa selama penulisan skripsi ini, di antaranya:

1. Ucapan terima kasih yang teramat sangat kepada Dr. Abinawanto selaku Pembimbing atas semua bimbingan, kesabaran, dukungan, doa, serta pengorbanan waktu dan pikiran selama penulis menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi.
2. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada Ibu Retno Lestari, M.Si., atas segala bimbingan, nasehat, motivasi, dan doa sejak penulis melakukan kerja praktik hingga menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Terima kasih kepada Ibu Dra. Noverita Dian Takarina, M.Sc., selaku Penasihat Akademik atas rasa perhatian, nasehat, dan doa selama penulis berkuliah.
4. Terima kasih kepada Dr. Dadang Kusmana dan Dr. Anom Bowolaksono atas kritik dan saran yang diberikan selama penulisan skripsi ini.
5. Terima kasih kepada Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc., selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI beserta seluruh staf pengajar atas semua ilmu pengetahuan yang diberikan selama perkuliahan.
6. Terima kasih kepada Pak Taryana, Pak Taryono, Mbak Asri, Bu Rus, dan seluruh staf karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas segala bantuan yang diberikan.
7. Terima kasih yang tak terhingga penulis ucapkan kepada teman seperjuangan 'ABA' (mbak Asmi, Bhe, dan Arief) atas segala bantuan, motivasi, kebersamaan dalam suka dan duka, serta semua kenangan yang diberikan.
8. Terima kasih kepada Karno, RaYen (Rara dan Yenyen), Kimbot, dan Bayu atas segala bantuan yang diberikan.

9. Ucapan terima kasih banyak kepada kakak-kakakku yang baik hati, Kak Edah, Kak Susan, Kak Dila, Ista, Nyonya, dan Iqbal atas tiap bantuan yang telah diberikan.
10. Juga kepada seluruh kawan seperjuangan di Laboratorium Genetika (Uci, Nurma, Prety, Kresna, Alyd, Mardha, Nia, dan Indria).
11. Terima kasih kepada semua kawan-kawan di keluarga besar Biologi Angkatan 2006 (Felix) atas semua dukungan dan jalinan pertemanan yang diberikan.
12. Terima kasih kepada kawan-kawan keluarga besar Biologi angkatan 2007, 2008, 2009 dan 2010, terima kasih atas semangat dan doa yang diberikan.
13. Ucapan terima kasih khusus penulis sampaikan kepada para penghuni *Laskar Pondok Rambutan* (Adisty, Widhie, Param, Siti, Nana, Aul, Sela, Yayah, dan Sovie) atas segala motivasi dan tempat berkeluh kesah penulis selama ini.
14. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada A2ng, Asma, Ida atas jalinan perkawanan selama ini.
15. Teruntuk mama dan bapak tersayang, terima kasih atas curahan cinta, kasih sayang, pengertian, bimbingan, nasehat, doa, dan segalanya yang telah diberikan sejak penulis hadir di dunia ini. Semoga ini merupakan langkah awal bagi penulis untuk terus dan terus berjuang demi kebanggaan kalian.
16. Terima kasih kepada adikku tersayang, Sigit, dan seluruh keluarga besar penulis atas kasih sayang dan doanya.

Pada akhirnya, penulis meminta maaf yang sebesar-besarnya atas segala kesalahan, baik sengaja ataupun tidak yang telah dilakukan. Semoga skripsi yang telah dibuat ini dapat bermanfaat bagi setiap 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 : Indah Prabawati Utami
NPM : 0606069861
Program Studi : S1 Reguler
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:
Fertilisasi spermatozoa ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) satu hari pascakriopreservasi menggunakan campuran metanol dan susu skim sebagai krioprotektan 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 : 15 Desember 2010
Yang menyatakan

(Indah Prabawati Utami)

ABSTRAK

Nama : Indah Prabawati Utami
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Fertilisasi Spermatozoa Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) Satu Hari Pascakriopreservasi Menggunakan Campuran Metanol dan Susu Skim sebagai Krioprotektan

Telah dilakukan penelitian mengenai fertilisasi spermatozoa ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) satu hari pascakriopreservasi dengan menggunakan campuran metanol dan susu skim sebagai krioprotektan. Tujuan penelitian adalah mengetahui kemampuan fertilisasi spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi menggunakan campuran 5% metanol dengan berbagai konsentrasi susu skim. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($P < 0,05$) antara kontrol (susu skim 0%) dan perlakuan dengan susu skim (18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap nilai rerata persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas. Hasil uji Dunnet ($P < 0,05$) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan di antara perlakuan dengan susu skim. Susu skim 18% merupakan konsentrasi yang paling efisien digunakan dalam kriopreservasi spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dengan nilai rerata persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi masing-masing sebesar $72,49 \pm 1,77\%$; $68,80 \pm 1,30\%$; $25,60 \pm 1,14\%$; dan $63,55 \pm 1,81\%$.

Kata kunci : kriopreservasi, fertilisasi, metanol, susu skim, ikan tawes, spermatozoa, sel telur, motilitas, viabilitas, abnormalitas, fertilitas.
xiv+79 halaman ; 20 gambar ; 5 tabel
Daftar Referensi : 79 (1983--2010)

ABSTRACT

Name : Indah Prabawati Utami
Program Study: Biology S1 Regular
Title : Sperm Fertilization of Java Barb (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) One Day Postcryopreservation Using Combination of Methanol and Skim Milk as Cryoprotectants

The research was about sperm fertilization of Java barb (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) one day postcryopreservation using combination of methanol and skim milk as cryoprotectants. The aim of the research was to investigate fertilizing capacity of cryopreserved sperm one day postcryopreservation using 5% methanol combined with various concentrations of skim milk. The Kruskal-Wallis showed that control (skim milk 0%) had a significant different ($P < 0,05$) average value of motility, viability, abnormality, and fertility on spermatozoa of java barb one day postcryopreservation than skim milk 18%, 19%, 20%, 21%, and 22% . The Dunnet showed that various concentrations of skim milk hadn't a significant different ($P < 0,05$). Skim milk 18% is the most effective concentration for sperm cryopreservation of Java barb, which gave average value of percentage in motility, viability, abnormality, and fertility for each $72,49 \pm 1,77\%$; $68,80 \pm 1,30\%$; $25,60 \pm 1,14\%$; and $63,55 \pm 1,81\%$.

Keywords : cryopreservation, fertilization, methanol, skim milk, java barb, spermatozoa, ovum, motility, viability, abnormality, fertility.
xiv+79 pages ; 20 pictures ; 5 tables
Bibliography : 79 (1983--2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Ikan Tawes.....	4
2.2 Karakteristik Semen dan Spermatozoa.....	6
2.2.1 Kualitas Spermatozoa.....	7
2.3 Sel Telur.....	8
2.4 Kriopreservasi.....	9
2.4.1 Definisi Kriopreservasi.....	9
2.4.2 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Kriopreservasi Spermatozoa..	10
2.4.2.1 Metode Pengambilan (Koleksi) Semen.....	10
2.4.2.2 Pengencer.....	11
2.4.2.3 Rasio Pengenceran.....	12
2.4.2.4 Bentuk Kemasan.....	12
2.4.2.5 Kondisi Ekuilibrasi.....	13
2.4.2.6 Laju Pembekuan (<i>Freezing Rate</i>) dan Pencairan (<i>Thawing Rate</i>).....	13
2.4.3 Faktor-Faktor Penyebab Kerusakan Sel Selama Kriopreservasi..	14
2.4.3.1 Kejut Dingin (<i>Cold Shock</i>).....	14
2.4.3.2 Pengaruh Derajat Keasaman (pH).....	14
2.4.3.3 Pembentukan Kristal Es Intraseluler dan Ekstraseluler...	14

2.4.3.4 Pengaruh Zat Terlarut.....	15
2.4.3.5 Pengaruh Volume.....	15
2.4.3.6 Toksisitas Krioprotektan.....	15
2.5 Metanol dan Susu Skim.....	16
2.5.1 Metanol.....	16
2.5.2 Susu Skim.....	17
2.6 Fertilisasi.....	18
3. METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	20
3.2 Alat.....	20
3.3 Bahan.....	21
3.3.1 Objek Penelitian.....	21
3.3.2 Pemeliharaan dan Penimbangan Berat Badan Ikan Tawes.....	21
3.3.3 Bahan Habis Pakai.....	22
3.4 Cara Kerja.....	22
3.4.1 Rancangan Penelitian.....	22
3.4.2 Pembuatan Larutan yang Digunakan dalam Kriopreservasi dan Fertilisasi.....	23
3.4.2.1 Larutan Ekstender <i>Fish Ringer</i>	23
3.4.2.2 Larutan Aktivator.....	23
3.4.2.3 Larutan Eosin-Y 0,5%.....	23
3.4.2.4 Larutan 0,15 M Dapar Fosfat pH 6,8.....	24
3.4.2.5 Larutan Giemsa.....	24
3.4.2.6 Larutan Pengencer.....	24
3.4.3 Pengoleksian Semen.....	25
3.4.4 Pengoleksian Sel Telur.....	25
3.4.5 Tahapan dalam Kriopreservasi.....	26
3.4.6 Analisis Spermatozoa.....	26
3.4.6.1 Analisis Volume, pH, dan Warna Semen.....	27
3.4.6.2 Penghitungan Persentase Motilitas Spermatozoa.....	27
3.4.6.3 Penghitungan Persentase Viabilitas Spermatozoa.....	29
3.4.6.4 Penghitungan Persentase Abnormalitas Spermatozoa.....	30
3.4.7 Fertilisasi Ikan Tawes.....	30

3.4.8	Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data.....	31
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1	Evaluasi Semen Ikan Tawes.....	33
4.1.1	Volume, Warna, dan pH Semen.....	33
4.2	Analisis Spermatozoa Ikan Tawes Segar (Prakriopreservasi).....	34
4.2.1	Persentase Motilitas Spermatozoa.....	34
4.2.2	Persentase Viabilitas Spermatozoa.....	37
4.2.3	Persentase Abnormalitas Spermatozoa.....	38
4.2.4	Persentase Fertilitas Spermatozoa.....	39
4.3	Analisis Spermatozoa Ikan Tawes Satu Hari Pascakriopreservasi.....	41
4.3.1	Persentase Motilitas Spermatozoa.....	41
4.3.2	Persentase Viabilitas Spermatozoa.....	44
4.3.3	Persentase Abnormalitas Spermatozoa.....	46
4.3.4	Persentase Fertilitas Spermatozoa.....	48
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
5.1	Kesimpulan.....	53
5.2	Saran.....	53
	DAFTAR REFERENSI.....	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Ikan tawes (<i>Barbonymus gonionotus</i>).....	5
Gambar 2.2.	Struktur testis pada ikan teleostei.....	7
Gambar 2.3.	Rumus bangun metanol.....	16
Gambar 3.1.	Kolam pemeliharaan ikan tawes.....	21
Gambar 3.2.	Skema pengenceran.....	28
Gambar 3.3.	Penghitungan motilitas dengan kamar hitung.....	29
Gambar 3.4.	Skema kerja penelitian.....	32
Gambar 4.1.	Skema inisiasi motilitas spermatozoa ikan air tawar.....	36
Gambar 4.2.	Viabilitas pada spermatozoa ikan tawes.....	37
Gambar 4.3.	Pembuatan preparat ulas.....	39
Gambar 4.4.	Sel telur ikan tawes yang tidak terbuahi.....	40
Gambar 4.5.	Perkembangan sel telur ikan tawes yang terbuahi.....	40
Gambar 4.6.	Proses metabolisme metanol.....	43
Gambar 4.7.	Diagram nilai rerata persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	43
Gambar 4.8.	Struktur <i>casein micelle</i> dan <i>submicelle</i>	45
Gambar 4.9.	Diagram nilai rerata persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	45
Gambar 4.10.	Morfologi spermatozoa.....	47
Gambar 4.11.	Diagram nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	48
Gambar 4.12.	Diagram nilai rerata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	50
Gambar 4.13.	Regulasi hormon dalam gametogenesis ikan.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Komposisi susu skim [Greenfields].....	18
Tabel 3.1.	Komposisi larutan pengencer yang digunakan.....	25
Tabel 4.1.	Data analisis semen dan spermatozoa segar ikan tawes.....	41
Tabel 4.2.	Data rerata persentase \pm standar deviasi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi) dan satu hari pascakriopreservasi.....	51
Tabel 4.3.	Data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	63
Lampiran 2	Uji homogenitas Levene terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	66
Lampiran 3	Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi (data hasil transformasi).....	69
Lampiran 4	Uji Kruskal-Wallis terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	72
Lampiran 5	Uji perbandingan berganda Dunnet terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.....	76

BAB 1 PENDAHULUAN

Kriopreservasi merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan ataupun materi genetika lain (termasuk semen dan oosit) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa memengaruhi organel di dalam sel, sehingga fungsi fisiologi, biologi, dan morfologi tetap ada (Gazali & Tambing 2001: 27). Teknik kriopreservasi lebih sering dilakukan pada spermatozoa dikarenakan proses pengawetannya lebih mudah dan lebih tahan terhadap suhu rendah saat penyimpanan dibandingkan ovum atau embrio (Jamieson 1991: 266).

Metode kriopreservasi spermatozoa ikan telah mengalami banyak perkembangan hingga saat ini, akan tetapi optimalisasi prosedur tetap diperlukan. Hal tersebut dikarenakan spermatozoa ikan tiap spesies memiliki karakteristik tertentu dengan tingkat sensitivitas yang berbeda dalam memberikan respons selama proses kriopreservasi (Kopeika *dkk.* 2005: 203). Optimalisasi dapat dilakukan pada hewan uji yang akan digunakan. Spesies ikan dari *family* Cyprinidae telah banyak digunakan sebagai hewan uji dalam teknik kriopreservasi spermatozoa ikan (Routray *dkk.* 2007: 2). Ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker 1850) merupakan salah satu spesies ikan *family* Cyprinidae. Ikan tawes dapat dijadikan sebagai hewan model dalam kriopreservasi seperti halnya ikan *family* Cyprinidae lainnya. Hal tersebut dikarenakan keunggulan dari ikan tawes, yaitu tingkat kematangan gonad yang relatif lebih cepat dibandingkan spesies ikan lainnya (Sukumasavin 2008: 133).

Tingkat keberhasilan kriopreservasi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah pengencer (Billiard *dkk.* 1995: 26). Pengencer yang digunakan terdiri atas ekstender dan krioprotektan. Larutan Ringer biasa digunakan dalam teknik kriopreservasi sebagai ekstender (Muchlisin 2005: 13). Krioprotektan, seperti halnya ekstender juga berperan penting dalam kriopreservasi. Krioprotektan dapat mengurangi kerusakan sel akibat pembentukan kristal es dan bahkan dapat menekan pembentukan kristal es. Krioprotektan dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu krioprotektan intraseluler dan krioprotektan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler dapat

menembus membran sel, sedangkan krioprotektan ekstraseluler tidak dapat menembus membran sel dan biasanya bekerjasama dengan krioprotektan intraseluler dalam melindungi sel dari kerusakan selama kriopreservasi (Jamieson 1991: 239--240).

Susu skim dapat digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler dalam kriopreservasi. Susu skim merupakan jenis susu yang memiliki kandungan lemak yang sangat rendah, yaitu hanya 0,1--0,3% . Susu skim diproses dengan cara menghilangkan sebagian besar atau hampir keseluruhan lemaknya (The Dairy Council 2010: 1). Susu skim digunakan dalam kriopreservasi karena dapat melindungi sel spermatozoa dari kerusakan sel selama proses kriopreservasi (Singsee *dkk.* 2005: 207). Penggunaan krioprotektan ekstraseluler seperti susu skim, biasanya dikombinasikan dengan jenis krioprotektan intraseluler, misalnya metanol. Metanol merupakan suatu larutan tidak berwarna yang mudah terbakar dengan bau yang cukup tajam, mirip dengan etil alkohol. Metanol dapat larut dalam air (Terra 2001: 1). Penggunaan kombinasi antara susu skim dan metanol sebagai krioprotektan dapat mempertahankan kualitas spermatozoa pascakriopreservasi. Penelitian mengenai kriopreservasi spermatozoa ikan dengan menggunakan campuran metanol dan susu skim sebagai krioprotektan telah dilakukan oleh Zuraida (2009) dan Anindita (2010).

Zuraida (2009: 68) melaporkan penelitian kriopreservasi spermatozoa ikan tawes menggunakan campuran krioprotektan berupa metanol dan susu skim. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi 5% metanol dengan 20% susu skim memberikan hasil yang terbaik dibandingkan konsentrasi susu skim lainnya (0%, 5%, 15%, dan 25%). Penelitian Anindita (2010: 58) yang menggunakan kombinasi krioprotektan berupa metanol dan susu skim menunjukkan bahwa penggunaan 10% metanol dengan berbagai konsentrasi susu skim (5%, 10%, 15%, dan 20%) mampu menjaga motilitas, viabilitas, dan mengurangi abnormalitas spermatozoa ikan gurami.

Fertilisasi merupakan proses penyatuan antara sel telur dengan spermatozoa untuk membentuk zigot. Fertilisasi dapat dibagi menjadi dua, yaitu fertilisasi internal dan eksternal. Fertilisasi yang umumnya terjadi pada ikan merupakan jenis fertilisasi eksternal, dikarenakan terjadi di luar tubuh induk

(Fujaya 2002: 173). Keberhasilan proses fertilisasi dipengaruhi oleh kemampuan spermatozoa membuahi sel telur. Spermatozoa yang tidak dikriopreservasi (segar) pada sebagian besar spesies memiliki kemampuan fertilisasi yang lebih tinggi dibandingkan spermatozoa pascakriopreservasi (Hiemstra *dkk.* 2005: 27). Hal tersebut dikarenakan teknik kriopreservasi menyebabkan terjadinya penurunan kualitas spermatozoa, seperti terjadinya perubahan dalam motilitas dan durasi pergerakan (Akçay *dkk.* 2004: 842). Penelitian mengenai fertilisasi spermatozoa pascakriopreservasi telah banyak dilakukan. Sultana *dkk.* (2010: 54) telah melakukan fertilisasi spermatozoa ikan mas. Hasil penelitian memperlihatkan terjadinya penurunan tingkat fertilitas akibat proses kriopreservasi, yaitu dari 88% menjadi hanya 32--37%. Penelitian Horvath *dkk.* (2003: 458) juga menunjukkan terjadinya penurunan kemampuan fertilisasi ikan mas pascakriopreservasi dari 84% (kontrol) menjadi hanya sekitar 71--74%. Namun demikian, pengaruh penggunaan krioprotektan berupa campuran 5% metanol dan berbagai konsentrasi (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) susu skim dalam fertilisasi spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi belum diketahui. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui tingkat fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi. Hasil penelitian tersebut diharapkan dapat diperoleh konsentrasi susu skim yang optimal dalam mempertahankan kemampuan fertilisasi spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mengetahui kemampuan fertilisasi spermatozoa satu hari pascakriopreservasi menggunakan campuran 5% metanol dengan berbagai konsentrasi susu skim. Hipotesis penelitian, yaitu campuran 5% metanol dengan konsentrasi susu skim 20% memberikan hasil yang terbaik dalam mempertahankan kemampuan fertilisasi spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Tawes

Menurut Chheng *dkk.* (2004: 4), ikan tawes dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Actinopterygii
Ordo : Cypriniformes
Family : Cyprinidae
Genus : *Barbonymus*
Species : *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850)

Ikan tawes memiliki beberapa nama lokal, di antaranya bader, putihan, tawes (Indonesia), *silver barb*, *javanese barb* (Inggris), *trey chhpin* (Kamboja), *nga gin shwewar* (Myanmar), tawes (Filipina), *pla ta pien* (Thailand), *cá mè vinh* (Vietnam), *barbo de Java* (Spanyol), *barbeau de Java* (Perancis), *rajputi* (Bangladesh), *ruhu* (India), dan *barbo-cumba* (Portugal) (CAB International 2006: 1).

Ikan tawes memiliki bentuk tubuh yang serupa dengan jenis ikan *family* Cyprinidae lainnya (Gambar 3.1). Bagian kepala ikan tawes kecil, dengan mulut yang meruncing ke arah terminal. Tubuh ikan tawes berwarna putih keperakan, terkadang dengan sedikit warna keemasan. Bagian sirip dorsal dan kaudal berwarna abu-abu hingga abu kekuningan. Bagian sirip anal dan *pelvic* berwarna jingga terang, sedangkan sirip pectoral berwarna kuning terang (Torres 2010: 1).



Gambar 2.1. Ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*)
[Sumber: Dokumentasi Pribadi.]

Ikan tawes merupakan ikan asli perairan Indonesia. Ikan tawes banyak ditemukan di sungai-sungai besar di wilayah Jawa, Sumatera, dan Kalimantan. Wilayah penyebarannya cukup luas, meliputi Laos dan Vietnam. Jenis ikan tawes yang banyak dikenal masyarakat, yaitu ikan tawes yang berwarna putih abu-abu, albino, berwarna abu-abu dengan bercak perak, dan ikan tawes dengan sirip perut relatif panjang. Pemijahan ikan tawes dapat dilakukan secara alami dan buatan. Induk yang digunakan dalam pemijahan mempunyai berat sekitar 300--500 g/ekor dan umur kematangan gonadnya 8--12 bulan. Jumlah telur yang dapat dihasilkan sekitar 1000 butir/gram berat badan. Umumnya induk betina dapat menghasilkan telur hingga 20.000 butir/ekor. Induk yang digunakan untuk pemijahan harus sehat, tidak mengalami cacat fisik, baik bentuk badan maupun sisiknya (Nugroho & Kristanto 2008: 119--120).

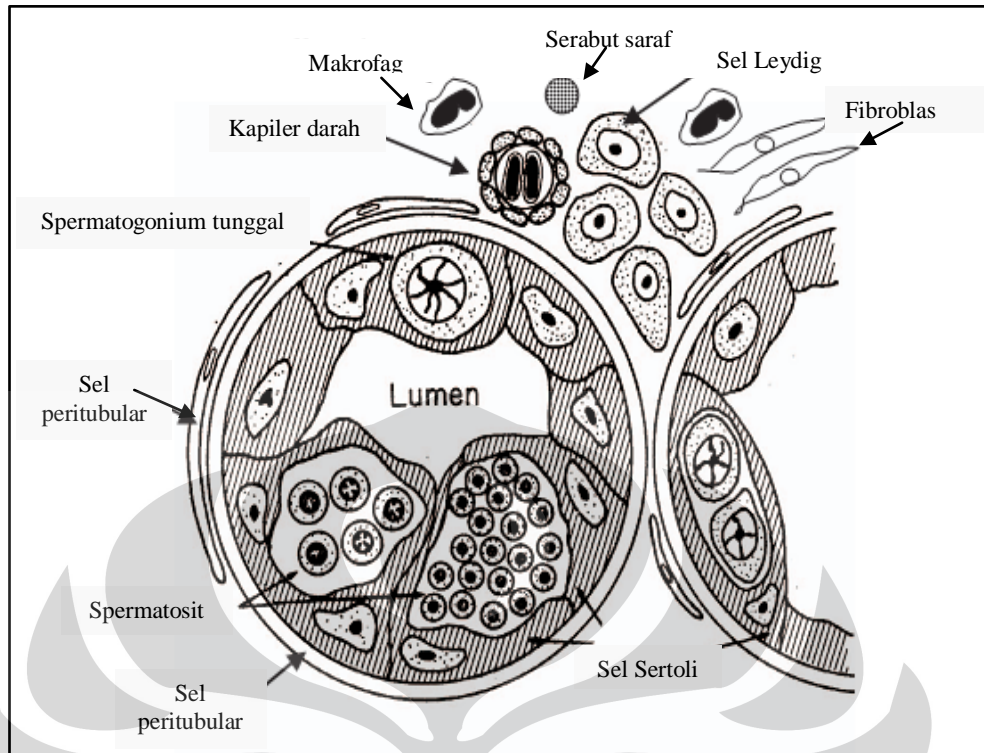
Pemijahan secara buatan dapat dilakukan dengan memberikan rangsangan menggunakan hormon analog GnRh dan domperidone [Ovaprim, Syndel]. Dosis hormon yang diberikan sebesar 0,35 ml/kg. Penyuntikan dapat dilakukan sebanyak satu hingga dua kali. Pemijahan biasanya terjadi setelah 6--14 jam dari penyuntikan pertama. Pemijahan ikan tawes biasanya terjadi pada malam hari, yaitu pukul 19.00--22.00. Pemijahan secara buatan dilakukan dengan cara mengumpulkan sel telur dan spermatozoa dengan cara pengurutan pada bagian perut induk (*stripping*). Sel telur dan spermatozoa dicampur, kemudian diaduk dengan menggunakan bulu ayam, dan ditambahkan air (Nugroho & Kristanto 2008: 120--121).

2.2 Karakteristik Semen dan Spermatozoa

Alavi & Cosson (2006: 2) mendefinisikan semen sebagai gabungan antara spermatozoa dan plasma semen. Plasma semen merupakan komponen penting yang berperan dalam metabolisme, fungsional, ketahanan hidup, dan motilitas spermatozoa. Kation seperti Na^+ , K^+ , dan Cl^- dalam plasma semen berfungsi menjaga keseimbangan osmotik, di sisi lain unsur esensial tersebut juga merupakan komponen bagi sebagian besar enzim yang penting (Verma *dkk.* 2009: 67). Komposisi plasma semen sangat memengaruhi kualitas semen, yang terekspresi melalui viabilitas dan motilitas spermatozoa. Faktor tersebut secara langsung berhubungan dengan keberhasilan fertilisasi (Bozkurt *dkk.* 2009: 2745).

Spermatozoa pada sebagian besar ikan dengan fertilisasi eksternal bersifat immotil (tidak bergerak) dalam plasma semen. Spermatozoa akan menjadi motil (dapat bergerak) ketika bersentuhan dengan lingkungan air. Perubahan ion dan lingkungan osmotik menjadi dua faktor eksternal yang berperan dalam inisiasi motilitas spermatozoa ikan. Spermatozoa ikan teleostei air tawar yang bersifat immotil pada lingkungan isotonik dalam plasma semen akan berubah menjadi motil ketika berada pada lingkungan yang hipotonik (He *dkk.* 2004: 1487--1488).

Spermatozoa merupakan sel kelamin jantan yang dihasilkan dalam *cyste seminiferus* yang terdapat dalam kantung-kantung testis. Bagian dalam *cyste seminiferus* terdapat sel Sertoli yang mempunyai fungsi nutritive, sedangkan bagian luar terdapat sel Leydig yang berperan menghasilkan hormon testosteron (Fujaya 2002: 160) (Gambar 2.2). Ukuran spermatozoa ikan berbeda-beda, tetapi rata-rata berkisar antara 40--60 μm dengan panjang kepala hanya 2--3 μm . Bentuk spermatozoa ikan pada spesies Cyprinidae terdiri atas dua bagian, yaitu kepala dan ekor. Bentuk tersebut memungkinkan spermatozoa dapat bergerak. Stimulasi dan lama pergerakan spermatozoa dipengaruhi oleh usia, kematangan spermatozoa, dan faktor lingkungan, seperti suhu, ion, pH, dan osmolalitas. Kecepatan pergerakan spermatozoa dapat berbeda pada tiap spesies. Kecepatan gerak tersebut berhubungan dengan kandungan ATP intraseluler yang dihasilkan oleh mitokondria (Fujaya 2002: 160, 164 & 166).



Gambar 2.2. Struktur testis pada ikan teleostei
[Sumber: Alavi *dkk.* 2007: 106.]

2.2.1 Kualitas Spermatozoa

Produksi dan kualitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh faktor usia, ukuran, dan fisiologis ikan. Kualitas spermatozoa yang jelek dapat diakibatkan oleh faktor genetik, pola makan, tekanan lingkungan (toksikan, kualitas air, kepadatan ikan) atau penyakit. Kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur dapat ditentukan dengan mengukur kualitas spermatozoa (Bozkurt 2006: 284 & 287). Kualitas spermatozoa dapat ditentukan dari beberapa parameter, tetapi yang umumnya digunakan adalah motilitas, viabilitas, dan abnormalitas.

Penentuan motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan menggunakan tiga metode, yaitu metode subjektif, semi-kuantitatif, dan kuantitatif dengan bantuan komputer. Metode subjektif dilakukan dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang bergerak, menentukan lama total pergerakan spermatozoa, atau kombinasi dari keduanya. Metode semi-kuantitatif dilakukan dengan cara menganalisis motilitas spermatozoa melalui rekaman video. Adapun metode kuantitatif dilakukan dengan menggunakan bantuan *Computer-Aided*

Sperm Analysis (CASA). Penggunaan sistem CASA lebih cepat dan efektif dibandingkan metode lainnya, tetapi biaya yang diperlukan juga lebih mahal (Rurangwa *dkk.* 2004: 4 & 9--11).

Parameter kualitas spermatozoa lainnya adalah viabilitas. Viabilitas spermatozoa dapat didefinisikan sebagai kemampuan hidup spermatozoa. Parameter viabilitas ditentukan dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang masih hidup. Viabilitas spermatozoa dapat dihitung dengan menggunakan pewarnaan diferensial yang mengacu pada kemampuan integritas membran sel (Rurangwa *dkk.* 2004: 7). Pewarnaan yang dapat digunakan untuk mengamati viabilitas spermatozoa adalah eosin. Eosin dapat digunakan untuk membedakan spermatozoa yang masih hidup dan telah mati. Spermatozoa yang telah mati akan terwarnai oleh eosin dan berwarna merah. Hal tersebut dikarenakan sel yang telah mati tidak mampu mempertahankan integritas membran selnya. Spermatozoa yang masih hidup memiliki kemampuan mempertahankan integritas membran sel, akibatnya sel tidak akan terwarnai oleh eosin (Salisbury & VanDemark 1985: 466; Arifiantini *dkk.* 2005: 370).

Abnormalitas spermatozoa juga merupakan parameter kualitas spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa ditunjukkan dengan adanya perubahan bentuk spermatozoa. Spermatozoa yang abnormal memiliki kemampuan fertilisasi yang lebih rendah dibandingkan spermatozoa normal (Rurangwa *dkk.* 2004: 8). Abnormalitas spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan metode pewarnaan Giemsa. Pewarna Giemsa akan menyebabkan spermatozoa berwarna biru atau keunguan (WHO 1988: 38).

2.3 Sel Telur

Sel telur merupakan alat perkembangbiakan pada hewan betina, yang dihasilkan oleh ovarium. Sel telur berukuran lebih besar dan lebih sederhana dibandingkan spermatozoa. Ukuran sel telur bervariasi pada setiap spesies. Ukuran sel telur yang bervariasi dikarenakan adanya kandungan kuning telur yang merupakan penyedia cadangan makanan bagi perkembangan embrio. Sel telur juga memiliki nukleus yang membawa setengah bagian informasi yang diperlukan

dalam reproduksi. Ukuran sel telur yang lebih besar dibandingkan spermatozoa menyebabkan produksi sel telur tidak sebanyak spermatozoa (Billiet & Burchill 2010: 1). Ukuran sel telur pada ikan bervariasi, yaitu antara 0,5--5 mm, tergantung pada kandungan kuning telur dan fekunditasnya. Fekunditas pada setiap individu berbeda, tergantung pada usia, ukuran, spesies, dan kondisi lingkungan, seperti pakan, suhu air, dan musim. Ukuran dan jumlah telur yang dihasilkan juga berkaitan dengan kemampuan merawat telur dan anak. Ikan yang memiliki telur-telur berukuran kecil biasanya mempunyai jumlah telur yang banyak (Fujaya 2002: 164). Jamieson (1991: 251) menyatakan bahwa kemampuan fertilisasi sel telur terbatas pada periode tertentu, yaitu beberapa detik atau menit setelah pemijahan. Oleh karena itu, proses fertilisasi harus sesegera mungkin dilakukan setelah sel telur dikeluarkan.

2.4 Kriopreservasi

2.4.1 Definisi Kriopreservasi

Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan materi genetik (mikroorganisme, organisme multiseluler berukuran kecil, gamet, sel somatik, dan embrio) pada suhu yang rendah (Simione 2003: 3). Metode kriopreservasi telah banyak diaplikasikan pada berbagai macam materi hidup, termasuk spermatozoa ikan. Penggunaan metode tersebut dapat memberikan banyak manfaat, di antaranya meningkatkan jumlah keturunan dari jantan yang berkualitas sangat baik, memberikan persediaan gamet jantan setiap waktu (Akca *dkk.* 2004: 837--838), sebagai perlindungan terhadap persediaan spermatozoa dari berbagai kejadian, seperti penyakit, bencana alam, atau kejadian lainnya, juga meningkatkan *selective breeding* dengan cara memelihara persediaan yang ada secara lebih ekonomis dan efektif, serta dapat digunakan sebagai bahan percobaan untuk studi selanjutnya (misalnya, transfer gen) (Muchlisin 2005: 12).

Prinsip kriopreservasi adalah mengatur perpindahan air keluar masuk sel melalui proses dehidrasi dan rehidrasi. Dehidrasi merupakan proses pengeluaran molekul air dari dalam sel, sedangkan rehidrasi adalah proses pemasukan kembali

molekul air ke dalam sel. Proses dehidrasi yang terjadi pada sel dapat menyebabkan kerusakan sel akibat sel mengalami kekeringan. Meski demikian, proses dehidrasi tetap diperlukan karena ketiadaan dehidrasi dapat menyebabkan pembentukan kristal es yang dapat merusak sel. Permasalahan yang disebabkan dehidrasi dapat diatasi dengan melakukan proses rehidrasi sebagai penyeimbang (Tambing 2005: 1). Dehidrasi pada proses kriopreservasi terjadi pada saat ekuilibrasi dan pembekuan, sedangkan rehidrasi terjadi pada saat pencairan (Simione 2003: 1). Rehidrasi pada saat pencairan terjadi akibat kristal-kristal es ekstraseluler mencair, sehingga cairan ekstraseluler bersifat hipotonis terhadap cairan intraseluler, dan akan masuk ke dalam sel. Peristiwa tersebut dapat terjadi pada saat laju pencairan cepat (Jamieson 1991: 235).

2.4.2 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Kriopreservasi Spermatozoa

Faktor-faktor yang dapat memengaruhi keberhasilan kriopreservasi spermatozoa, di antaranya metode pengambilan (koleksi) semen, pengencer, rasio pengenceran, bentuk kemasan, kondisi ekuilibrasi, laju pembekuan (*freezing rate*), laju pencairan (*thawing rate*) (Billiard *dkk.* 1995: 26), dan kondisi fertilisasi (Kopeika *dkk.* 2005: 203).

2.4.2.1 Metode Pengambilan (Koleksi) Semen

Sampel semen yang akan digunakan dapat diambil melalui dua cara, yaitu pengurutan (*stripping*) dan pembedahan. Metode pengurutan dilakukan dengan cara menekan bagian abdomen hewan uji coba ke arah lubang urogenital, sehingga semen dapat diambil (Lahnsteiner *dkk.* 2002: 196). Semen yang keluar ditampung dalam wadah berupa tabung, *syringe*, atau gelas Beaker. Semen yang diambil dengan metode pengurutan biasanya akan terkontaminasi dengan air, lendir, urin, dan feses. Pembersihan bagian luar lubang urogenital dengan menggunakan tisu dapat mengurangi kontaminasi. Metode pengurutan berbeda dengan metode pembedahan. Perbedaannya, yaitu dalam metode pengurutan tidak perlu mengorbankan hewan percobaan untuk mendapatkan sampel

(Sukumasavin 2008: 158). Metode pembedahan dilakukan dengan cara membedah tubuh hewan dan mengambil semen dari bagian testisnya. Metode pembedahan biasanya dilakukan apabila semen yang diinginkan sulit diperoleh melalui pengurutan. Metode pembedahan umumnya dilakukan pada spesies ikan dari *family Clariidae* (Muchlisin *dkk.* 2004: 27).

2.4.2.2 Pengencer

Pengencer merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kriopreservasi. Pengencer terdiri atas ekstender dan krioprotektan (intraseluler dan ekstraseluler). Ekstender merupakan medium yang digunakan dalam pengenceran spermatozoa dan dapat meningkatkan kemampuan fertilisasi spermatozoa pascakriopreservasi (Muchlisin 2005: 12). Ekstender tidak menginduksi motilitas spermatozoa, tetapi tetap mempertahankan viabilitasnya selama kriopreservasi (Routray *dkk.* 2007: 11). Jenis ekstender yang biasa digunakan, di antaranya larutan fisiologis, larutan Ringer, dan larutan salin.

Krioprotektan berfungsi untuk melindungi sel dari kerusakan selama proses pembekuan dan pencairan. Krioprotektan dibedakan menjadi dua, yaitu krioprotektan intraseluler yang dapat menembus membran sel dan krioprotektan ekstraseluler yang tidak mampu menembus membran sel (Jamieson 1991: 239--240). Menurut Singsee *dkk.* (2005: 207), krioprotektan intraseluler meliputi DMSO, gliserol, dan etilen glikol, sedangkan contoh krioprotektan ekstraseluler, yaitu gula (sukrosa), polimer, pati, PVP, protein (kuning telur dan susu skim).

Menurut Alvarenga *dkk.* (2005 *dalam* Arifiantini *dkk.* 2010: 68 & 72), krioprotektan yang sesuai digunakan dalam kriopreservasi harus memiliki karakteristik seperti memiliki berat molekul yang ringan, toksisitas rendah, dan dapat dilarutkan dalam air terdestilasi. Krioprotektan dapat dibedakan berdasarkan komponen utamanya, yaitu kelompok alkohol (etilen glikol, gliserol, dan lainnya) dan amida (dimetilformamida, asetida, metilformamida, dan lainnya). Kemampuan krioprotektan melindungi spermatozoa selama kriopreservasi dipengaruhi oleh tiga faktor utama, yaitu mekanisme kerja, tipe, dan konsentrasi. Krioprotektan dapat mencegah pembentukan kristal es,

meskipun juga bersifat toksik bagi spermatozoa selama ekuilibrase dan pascapencapaian (Arifiantini *dkk.* 2010: 72).

2.4.2.3 Rasio Pengenceran

Rasio pengenceran berperan penting dalam proses kriopreservasi. Semen yang memiliki konsentrasi spermatozoa tinggi memerlukan rasio pengenceran yang lebih besar dibandingkan semen dengan konsentrasi yang rendah. Rasio pengenceran dapat bervariasi pada tiap spesies, bahkan di antara individu (Kopeika *dkk.* 2005: 212). Menurut Jamieson (1991: 264), umumnya rasio pengenceran (semen : ekstender) yang digunakan adalah 1: 3 hingga 1: 4.

Rasio pengenceran dalam larutan yang digunakan untuk fertilisasi buatan juga berperan penting dalam keberhasilan fertilisasi. Rasio pengenceran yang melebihi 1 : 10 (semen : telur) dapat menurunkan tingkat fertilitas ikan. Rasio pengenceran sebesar 1 : 1 pada fertilisasi ikan mas memberikan persentase fertilitas sebesar 70% pada tahap *eyed stage*. Penggunaan rasio 1 : 100 menyebabkan hanya beberapa telur yang berhasil mencapai *eyed stage* (Jamieson 1991: 268--269).

2.4.2.4 Bentuk Kemasan

Kemasan yang digunakan dalam kriopreservasi terbuat dari bahan plastik atau gelas dikarenakan memiliki nilai toleransi yang sangat tinggi terhadap suhu yang sangat rendah (Sukumasavin 2008: 156). Bentuk kemasan yang umumnya digunakan dalam kriopreservasi, di antaranya pelet, ampul (0,25 ml), *straw* (0,25 dan 0,5 ml), *minitube* (0,25; 0,3; dan 0,5 ml), dan *macrotube* (5 ml) (Arifiantini & Yusuf 2004: 2). Kemasan berbentuk *cryotube* paling mudah digunakan dalam kriopreservasi. Hal tersebut dikarenakan *cryotube* tidak memerlukan tempat penyimpanan yang luas, laju pendinginan yang terjadi dapat terkontrol dan pengemasannya lebih praktis karena terbuat dari bahan plastik dengan tutup berulir (Simione 2003: 7--8).

2.4.2.5 Kondisi Ekuilibrasi

Ekuilibrasi merupakan periode adaptasi spermatozoa terhadap perubahan osmotik yang terjadi akibat penambahan larutan pengencer dan perubahan suhu sebelum pembekuan. Penggunaan krioprotektan memengaruhi waktu ekuilibrasi yang diperlukan. Semakin cepat waktu yang diperlukan krioprotektan untuk masuk ke dalam sel, maka semakin cepat waktu ekuilibrasi yang diperlukan (Routray *dkk.* 2007: 13).

2.4.2.6 Laju Pembekuan (*Freezing Rate*) dan Pencairan (*Thawing Rate*)

Laju pembekuan merupakan kecepatan air untuk keluar dari dalam sel ketika terjadi peningkatan konsentrasi larutan ekstraseluler pada saat pembekuan. Laju pembekuan dapat dibedakan menjadi laju pembekuan cepat dan lambat. Laju pembekuan cepat terjadi apabila penurunan suhu sebesar -10°C , sedangkan laju pembekuan lambat terjadi jika penurunan suhu sebesar -2°C (Viveiros *dkk.* 2000: 1399 & 1406). Penggunaan laju pembekuan cepat dapat mengurangi dehidrasi sel, tetapi dapat meningkatkan pembentukan kristal es intraseluler. Laju pembekuan lambat dapat mengurangi pembentukan kristal es intraseluler, tetapi meningkatkan konsentrasi elektrolit sehingga dapat menyebabkan dehidrasi sel (Li Jun *dkk.* 2006: 370).

Pencairan merupakan proses pencairan kembali sampel semen yang telah dibekukan. Kondisi pencairan harus dibuat optimal untuk mencegah terjadinya rekristalisasi (pembentukan kembali kristal es). Spesies ikan *family* Cyprinidae umumnya menggunakan laju pencairan cepat. Laju pencairan lambat tidak digunakan karena dapat menyebabkan rekristalisasi yang dapat merusak sel (Routray *dkk.* 2007: 13). Waktu yang diperlukan dalam proses pencairan dapat berbeda pada tiap jenis kemasan yang digunakan. Kemasan plastik memerlukan waktu pencairan yang lebih lama dibandingkan kemasan yang terbuat dari kaca (Simione 2003: 7--8).

2.4.3 Faktor-Faktor Penyebab Kerusakan Sel Selama Kriopreservasi

2.4.3.1 Kejutan Dingin (*Cold Shock*)

Kejutan dingin dapat terjadi akibat perubahan suhu yang sangat rendah. Kejutan dingin terjadi akibat adanya perubahan fosfolipid membran sel dari fase cair ke fase padat. Kejutan dingin dapat menyebabkan spermatozoa mengalami penurunan aktivitas flagela dan kerusakan membran sel. Kejutan dingin umumnya terjadi apabila digunakan laju pembekuan cepat (Jamieson 1991: 236).

2.4.3.2 Pengaruh Derajat Keasaman (pH)

Perbedaan nilai pH dalam larutan ekstender yang digunakan dapat memengaruhi motilitas spermatozoa. Penelitian Muchlisin *dkk.* (2004: 31) menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa tertinggi terjadi dalam larutan Ringer (pH 7,9) yang memiliki nilai pH serupa dengan plasma semen pada spesies *tropical bagrid catfish* (8,0). Hal tersebut mengindikasikan bahwa motilitas tertinggi spermatozoa yang dibekukan, yaitu pada larutan yang memiliki nilai pH mirip dengan plasma semen.

2.4.3.3 Pembentukan Kristal Es Intraseluler dan Ekstraseluler

Kristal es intraseluler biasanya lebih sering terjadi pada saat pencairan dibandingkan pembekuan. Pembentukan kristal es intraseluler dapat menyebabkan kerusakan struktur membran sel. Tingkat kerusakan yang terjadi tergantung besar kecilnya ukuran kristal yang terbentuk (Leung 1991: 237).

Pembentukan kristal es ekstraseluler biasanya terjadi apabila menggunakan laju pembekuan lambat. Kristal es ekstraseluler yang terbentuk dapat menyebabkan terjadinya kerusakan membran sel. Kristal es ekstraseluler juga dapat menyebabkan dehidrasi sel akibat perbedaan konsentrasi sel, sehingga cairan intrasel tertarik ke luar (Jamieson 1991: 237).

2.4.3.4 Pengaruh Zat Terlarut

Selama proses pembekuan, baik cairan intraseluler maupun ekstraseluler akan bersifat lebih pekat (konsentrat). Pemberian larutan berkonsentrasi tinggi pada saat menggunakan laju pembekuan lambat akan menyebabkan terjadinya kerusakan membran sel. Kerusakan tersebut dapat terjadi akibat pengaruh denaturasi garam-garam elektrolit dalam lipoprotein membran ataupun akibat pengaruh tekanan osmotik dalam membran sel (Jamieson 1991: 237).

2.4.3.5 Pengaruh Volume

Stress yang terjadi pada membran sel dapat disebabkan oleh reduksi volume ataupun pengaruh tekanan osmotik dari larutan konsentrat. Perubahan volume sel dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Meskipun sel memiliki toleransi terhadap perubahan volume, tetapi toleransi tersebut bersifat terbatas. Perubahan volume sel dapat disebabkan hiperosmositas akibat pembentukan kristal es ekstraseluler. Volume sel juga dapat berubah akibat penambahan dan pengurangan krioprotektan (Jamieson 1991: 237--239).

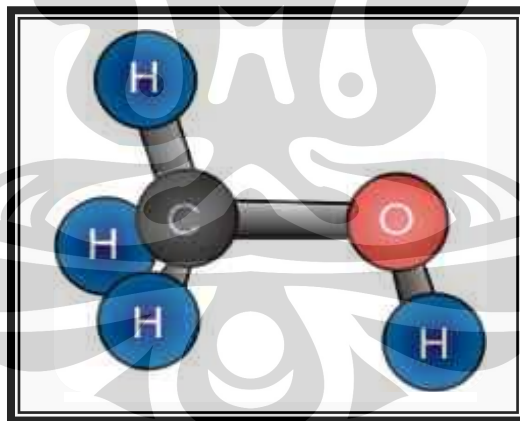
2.4.3.6 Toksisitas Krioprotektan

Penggunaan krioprotektan yang tepat dapat menekan timbulnya kerusakan sel, tetapi penggunaan dengan konsentrasi tinggi merupakan racun bagi material biologis. Pengaruh krioprotektan berkonsentrasi tinggi menjadi lebih berbahaya dibandingkan dengan fungsi perindungannya. Kerusakan sel akibat penggunaan konsentrasi krioprotektan yang tidak tepat telah banyak terjadi. Penggunaan campuran DMSO dan polietilen glikol dapat menginduksi penyatuan membran, sedangkan penggunaan metanol yang dibekukan dalam suhu di bawah 30° C menyebabkan kegagalan pemulihan jantung (Jamieson 1991: 239).

2.5 Metanol dan Susu Skim

2.5.1 Metanol

Metanol dikenal juga dengan nama metil alkohol, yang merupakan bentuk paling sederhana dari suatu seri bahan organik yang disebut alkohol. Rumus molekul metanol adalah CH_3OH (Gambar 2.3). Titik didih metanol sebesar $64,96^\circ \text{C}$ ($148,93^\circ \text{F}$) dan titik bekunya sebesar $-93,9^\circ \text{C}$ (-137°F). Berat molekul metanol adalah $32,042 \text{ kg/kmol}$ (CEC 2010: 1). Metanol merupakan suatu larutan tidak berwarna yang mudah terbakar dengan bau yang cukup tajam, mirip dengan etil alkohol. Metanol bersifat dapat larut dalam air (Terra 2001: 1). Sebagian besar metanol dihasilkan dari komponen metan gas alam. Metanol murni merupakan bahan baku penting dalam sintesis bahan kimia. Turunan metanol banyak digunakan dalam berbagai industri, seperti industri obat, parfum, otomotif, bahan bakar roket, dan lainnya. Metanol dapat berperan sebagai zat anti beku (*anti-freeze*) seperti halnya gliserol, dimetil sulfoksida, propilen glikol, sukrosa, dan trehalosa (Ahammad *dkk.* 2002: 15).



Gambar 2.3. Rumus bangun metanol
[Sumber: Thru 2007: 1.]

Molekul metanol yang kecil menyebabkan senyawa tersebut dapat menembus membran sel. Sifatnya yang demikian menyebabkan metanol digolongkan ke dalam kelompok krioprotektan intraseluler (Singsee *dkk.* 2005: 207). Penggunaan metanol dalam kriopreservasi telah banyak dilakukan. Penelitian Ahammad *dkk.* (2002: 114--115) melaporkan bahwa penggunaan

metanol berkonsentrasi rendah (1,5 M) lebih efektif digunakan dalam kriopreservasi yang bersuhu di atas 0° C, sedangkan metanol berkonsentrasi tinggi (2,5 M) efektif digunakan pada suhu di bawah 0° C. Konsentrasi metanol yang digunakan dalam kriopreservasi spermatozoa ikan dapat berbeda. Anindita (2010: 19) menggunakan metanol dengan konsentrasi 15% pada spesies ikan gurami. Adapun Zuraida (2009: 33) menggunakan konsentrasi metanol yang lebih rendah, yaitu sebesar 5% pada kriopreservasi spermatozoa ikan tawes.

2.5.2 Susu Skim

Susu skim merupakan jenis susu yang memiliki kandungan lemak yang sangat rendah, yaitu hanya 0,1--0,3% . Susu skim diproses dengan cara menghilangkan sebagian besar lemaknya (The Dairy Council 2010: 1). Komposisi nutrisi yang terkandung dalam susu skim, yaitu lemak (< 0,5% dari total nutrisi), kalori (90 mg), dan kalsium (316 mg). Kadar kalsium pada susu skim lebih banyak dibandingkan susu biasa. Hal tersebut dikarenakan dalam proses pembuatan susu skim, beberapa nutrisi terkadang ditambahkan ke dalamnya, di antaranya beberapa vitamin (vitamin A dan D), fosfor, dan magnesium (Rajeev 2010: 1 & 2). Kandungan protein yang terdapat dalam susu skim sama dengan jenis susu lainnya. Kandungan protein dalam susu dibedakan menjadi dua jenis, yaitu protein serum dan kasein. Komposisi kasein dalam susu mencapai lebih dari 80% (Varnam & Sutherland 2001: 8). Susu juga mengandung senyawa laktenin yang bersifat racun bagi spermatozoa. Menurut Salisbury & VanDemark (1985: 588), toksisitas laktenin dapat diminimalkan dengan cara memanaskan susu.

Susu skim digunakan dalam kriopreservasi karena dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan sel selama proses kriopreservasi (Singsee *dkk.* 2005: 207). Penelitian Nai-Hsien Chao *dkk.* (1987: 107) menunjukkan bahwa penggunaan susu skim pada kriopreservasi spermatozoa ikan tilapia dapat mempertahankan motilitas hingga 80%. Zuraida (2009: 68) dan Anindita (2010: 58) juga melaporkan bahwa penggunaan susu skim dapat memberikan

perlindungan yang cukup efektif dalam kriopreservasi spermatozoa ikan dibandingkan tanpa menggunakan susu skim.

Tabel 2.1. Komposisi susu skim [Greenfields]

Komposisi	Persentase (%)
Lemak total	0
Protein	14
Karbohidrat total	4
Natrium	4
Vitamin A	50
Vitamin B1	25
Vitamin B2	20
Vitamin D	50
Vitamin E	25
Kalsium	25
Seng	25
Magnesium	35
Fosfor	40

2.6 Fertilisasi

Menurut Yustina *dkk.* (2003: 130), keberhasilan fertilisasi tergantung pada kualitas dan kuantitas spermatozoa. Keberhasilan fertilisasi juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain, seperti guncangan, suhu, dan waktu. Menurut Afandi & Tang (2000 *dalam* Yustina *dkk.* 2003: 130), guncangan air pada saat perhitungan fertilitas dapat mengakibatkan penurunan tingkat keberhasilan fertilisasi. Penelitian Yustina *dkk.* (2003: 130) melaporkan bahwa suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang penting dalam memengaruhi daya tetas ikan dan mortalitas larva.

Rasio perbandingan yang digunakan dalam fertilisasi dapat bervariasi, tergantung spesies dan prosedur kerja, tetapi biasanya berkisar antara 10^4 -- 10^7 spermatozoa/telur (Hiemstra *dkk.* 2005: 27). Menurut Rurangwa *dkk.* (1998 *dalam* Sunarma 2007: 26), fertilisasi telur dengan menggunakan spermatozoa pascakriopreservasi dilakukan segera setelah proses pencairan dengan rasio

perbandingan antara spermatozoa dan sel telur yang tepat. Rasio perbandingan yang terlalu tinggi ataupun terlalu rendah dapat memengaruhi keberhasilan tingkat fertilisasi dan penetasan telur. Rasio perbandingan antara spermatozoa dan sel telur pada fertilisasi yang menggunakan spermatozoa pascakriopreservasi biasanya lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan spermatozoa segar akibat adanya penurunan kemampuan spermatozoa. Penurunan tersebut terjadi akibat adanya kerusakan pada genom spermatozoa yang mungkin terjadi pada saat proses kriopreservasi (Sunarma 2007: 26).



BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian fertilisasi sperma ikan tawes pascakriopreservasi dilakukan di dua lokasi, yaitu Laboratorium Genetika dan rumah kaca, Departemen Biologi FMIPA-UI. Penelitian berlangsung selama lima bulan, terhitung sejak Juli 2010 hingga November 2010.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian, di antaranya kolam pemeliharaan yang terbuat dari semen, ember plastik [Lion Star], bak plastik [Lion Star], kabel rol, jaring, *deep freezer* [Daichi DCF-126], lemari pendingin [Bauknecht], *waterbath* [PS Thelco], timbangan analitik [Precisa], timbangan kasar [Five Goats], kamar hitung *Improved Neubauer* [Assistent], *hand counter* [Joy-Art], kaca objek dan kaca penutup [Sail], pipet mikro (0,5-10 μ l, 10-100 μ l, & 100-1000 μ l) [BOECO & Eppendorf], *tips* [Fisherbrand[®] & Sorenson], *cryotube vials* 2 ml [Sorenson], bejana gelas 100 ml dan 250ml [IWAKI Pyrex[®]], gelas ukur 100ml [IWAKI Pyrex[®]], kertas pH skala 5--10 [ART 9531 Merck], batang pengaduk, cawan petri, *laptop* [A-Note], kamera digital 8,1 MP [FujiFilm Finepix], mikroskop cahaya [BOECO BM-180], mikroskop trinokuler [BOECO BM-180] yang terhubung dengan kamera digital *eye piece* [MDCE-5A] dan *laptop*, *image driving software* [Scopephoto 2.0.4], *software* perhitungan statistik [*Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for Windows*], dan *software* tabulasi data [*Microsoft Office Excel 2007*].

3.3 Bahan

3.3.1 Objek Penelitian

Objek penelitian yang digunakan adalah ikan tawes jantan dan betina yang telah matang gonad. Ikan tawes didapatkan dari kolam budidaya di daerah Ciseeng, Bogor. Ikan tawes jantan dan betina yang digunakan dalam penelitian masing-masing sejumlah 30 ekor dan 7 ekor.

3.3.2 Pemeliharaan dan Penimbangan Berat badan Ikan Tawes

Ikan tawes yang digunakan selama penelitian dipelihara dalam kolam semen yang dibedakan antara induk jantan dan betina. Pemeliharaan dilakukan di kolam yang berada samping rumah kaca Departemen Biologi, FMIPA UI. Ikan tawes tersebut diberikan pakan alami dan buatan. Pakan alami yang diberikan, yaitu daun singkong dan *Lemna* sp.. Pakan buaatannya berupa pelet apung [Suri Tani Pemuka SPA-A5]. Pakan diberikan sebanyak dua kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari. Berat badan ikan yang akan disuntik, terlebih dahulu ditimbang dengan menggunakan timbangan kasar.



Gambar 3.1. Kolam pemeliharaan ikan tawes
[Sumber: Dokumentasi Pribadi.]

3.3.3 Bahan Habis Pakai

Bahan-bahan kimia yang digunakan, di antaranya metanol [Merck], larutan ekstender *fish ringer* (NaCl [Merck], KCl [Merck], CaCl₂.2H₂O [Merck], NaHCO₃ [Merck]), larutan stok Giemsa [Merck], larutan aktivator sperma (NaCl 45 mM [Merck], KCl 5 mM [Merck], Tris 30 mM (pH 8,0) [Promega]), larutan 0,15 M dapar fosfat 6,8 (5,34 g Na₂HPO₄.2H₂O [Merck], 4,08 g KH₂PO₄ [Merck], eosin-Y [Merck], air kolam, vitamin ikan [IPI], metilen biru (obat anti jamur), akuades steril [IKA], alkohol 70% [IKA], aluminium foil [Klin Pak], kertas label [Tom & Jerry], kertas saring, tisu [Tessa], dan susu skim cair [Diamond].

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental yang disusun berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL), sehingga tiap satuan percobaan mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan setiap perlakuan (Hidayaturrahmah 2007: 1). Perlakuan yang diberikan dalam penelitian, yaitu dengan cara mencampurkan sel telur ke dalam cawan petri yang telah berisi spermatozoa dan air kolam. Krioprotektan yang diberikan untuk kriopreservasi spermatozoa berupa campuran 5% metanol dan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%). Pemilihan konsentrasi tersebut didasarkan pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Zuraida (2009: 33). Konsentrasi susu skim yang digunakan dalam penelitian sebelumnya dijadikan sebagai nilai tengah, sedangkan dua konsentrasi yang lebih rendah dan lebih tinggi digunakan untuk ketelitian dalam menguji kebenaran hipotesis (Hanafiah 2004: 11). Fertilisasi spermatozoa segar dijadikan sebagai kontrol positif (K+), sedangkan konsentrasi susu skim 0% dijadikan sebagai kontrol negatif (K-).

Keseluruhan jumlah perlakuan adalah enam perlakuan, dengan pengulangan yang dilakukan sebanyak lima kali. Hal tersebut didasarkan pada

rumus Frederer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$, dengan t adalah jumlah perlakuan dan r adalah jumlah ulangan (Hanafiah 2004: 12). Perlakuan yang diberikan, yaitu fertilisasi dengan menggunakan semen pascakriopreservasi, yang terdiri atas:

- a. Semen dengan 5% metanol, tanpa susu skim (SS 0%),
- b. Semen dengan 5% metanol + 18% susu skim (SS 18%),
- c. Semen dengan 5% metanol + 19% susu skim (SS 19%),
- d. Semen dengan 5% metanol + 20% susu skim (SS 20%),
- e. Semen dengan 5% metanol + 21% susu skim (SS 21%),
- f. Semen dengan 5% metanol + 22% susu skim (SS 22%).

3.4.2 Pembuatan Larutan yang Digunakan dalam Kriopreservasi dan Fertilisasi

3.4.2.1 Larutan Ekstender *Fish Ringer*

Pembuatan *fish Ringer* sesuai dengan metode Ginsburg. Larutan tersebut dibuat dengan cara melarutkan 3,25 g NaCl; 0,125 g KCl; 0,175 g CaCl₂.2H₂O; 0,1 g NaHCO₃ dengan akuades hingga volumenya 500 ml. Lama penyimpanan larutan tersebut maksimal 3 hari pada suhu 4 °C (Draper & Moens 2009: 1).

3.4.2.2 Larutan Aktivator

Pembuatan larutan aktivator dilakukan dengan cara melarutkan 45 mM NaCl (0,26 g NaCl, berat molekul 58 g/mol), 5 mM KCl (0,037 g KCl, berat molekul 74,5 g/mol), dan 30 mM Tris (0,36 g C₄H₁₁NO₃, berat molekul 121 g/mol) dalam 100 ml akuades (Sunarma 2007: 33).

3.4.2.3 Larutan Eosin-Y 0,5%

Larutan eosin-Y 0,5% dibuat dengan cara melarutkan eosin-Y sebanyak 0,5 g ke dalam akuades hingga volumenya 100 ml (WHO 1988: 36).

3.4.2.4 Larutan 0,15 M Dapar Fosfat pH 6,8

Larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8 dibuat dengan cara menyiapkan terlebih dahulu 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 dengan cara melarutkan 5,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam akuades hingga volumenya 200 ml. Larutan KH_2PO_4 dibuat dengan cara melarutkan 4,08 g KH_2PO_4 ke dalam akuades hingga volumenya 200 ml. Larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8 dapat dibuat dengan mencampurkan sedikit demi sedikit larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam larutan KH_2PO_4 hingga pHnya mencapai 6,8 (WHO 1988: 38).

3.4.2.5 Larutan Giemsa

Pembuatan larutan Giemsa dilakukan dengan cara mencampur 1 bagian larutan stok Giemsa dan 10 bagian larutan 0,15 M dapar fosfat pH 6,8 yang selanjutnya disaring dengan kertas saring (WHO 1988: 38).

3.4.2.6 Larutan Pengencer

Pengencer yang digunakan terdiri atas ekstender *fish Ringer*, metanol, dan susu skim. Pembuatan larutan tersebut dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama adalah memanaskan susu skim yang akan digunakan. Pemanasan dilakukan dengan cara memasukkan susu skim dalam wadah yang terbuat dari gelas, lalu direndam dalam *water bath* berisi air panas (suhu 87--90° C) selama 1 menit. Susu skim kemudian didinginkan pada suhu kamar. Tahap kedua adalah mencampurkan *fish Ringer* dengan susu skim sesuai komposisi yang telah ditentukan sebelumnya. Campuran tersebut dibuat dalam beberapa *cryotube* yang telah diberi label, kemudian disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4° C. Campuran dihomogenkan dengan cara mengeluarkan dan menghisap campuran sebanyak 10 kali dengan menggunakan pipet mikro. Metanol dimasukkan

terakhir kali setelah penambahan semen ke dalam *cryotube*. Perbandingan larutan pengencer dan semen yang digunakan, yaitu 1: 9 (Sunarma 2007: 34).

Tabel 3.1. Komposisi larutan pengencer yang digunakan

Perlakuan	Larutan pengencer			Semen (μ l)
	<i>fish Ringer</i> (μ l)	Metanol 5% (μ l)	Susu skim (μ l)	
Kontrol segar	-	-	-	30
Susu skim 0%	255	15	-	30
Susu skim 18%	201	15	54	30
Susu skim 19%	198	15	57	30
Susu skim 20%	195	15	60	30
Susu skim 21%	192	15	63	30
Susu skim 22%	189	15	66	30

3.4.3 Pengoleksian Semen

Semen yang akan digunakan diperoleh dengan cara pengurutan pada bagian abdomen. Bagian abdomen dan urogenital terlebih dahulu dibersihkan dengan kertas tisu sebelum dilakukan pengurutan. Tujuannya untuk mencegah kontaminasi semen dari urin, lendir, dan feses. Semen yang keluar ditampung dalam *cryotube* untuk dilakukan analisis segar. Volume semen yang dikoleksi, yaitu sebanyak 30 μ l untuk tiap perlakuan.

3.4.4 Pengoleksian Sel Telur

Induk betina yang akan diambil telurnya, disuntik terlebih dahulu dengan hormon analog GnRh dan domperidone [Ovaprim, Syndel] dengan dosis sebesar 0,35 ml/kg berat badan (Nugroho & Kristanto 2008: 120). Penyuntikan dilakukan secara intramuskular dibelakang sirip pektoral (Rahman *dkk.* 2009: 146). Penyuntikan dilakukan sebanyak dua kali dengan jeda waktu 6 jam. Metode tersebut digunakan berdasarkan pada hasil prapenelitian yang menunjukkan

bahwa penyuntikan sebanyak satu kali dengan jeda waktu kurang atau lebih dari enam jam tidak memicu pemijahan pada induk betina. Pemijahan pada ikan tawes biasanya terjadi pada pukul 19.00--22.00. Apabila tampak adanya tanda-tanda pemijahan (pengeluaran telur), sesegera mungkin induk betina diambil dan telurnya dikoleksi. Telur yang berhasil dikoleksi ditampung dalam wadah plastik yang kering (tanpa pemberian air).

3.4.5 Tahapan dalam Kriopreservasi

Sampel yang akan dilakukan kriopreservasi terlebih dahulu melalui beberapa tahap perlakuan, yaitu ekuilibrase, pembekuan, dan pencairan. Ekuilibrase perlu dilakukan sebelum pembekuan guna mengadaptasikan spermatozoa. Ekuilibrase dilakukan pada suhu 4--5° C dalam lemari pendingin. Lama ekuilibrase adalah 20 menit (Sunarma 2007: 35).

Pembekuan dilakukan dengan cara menyimpan *cryotube* berisi semen di dalam *deep freezer* pada suhu -34° C selama satu hari (Zuraida 2009: 38). Proses pencairan dilakukan dengan cara merendam setengah bagian *cryotube* berisi semen ke dalam *water bath* pada suhu 40° C selama 15 detik (Horvath *dkk.* 2003: 458).

3.4.6 Analisis Spermatozoa

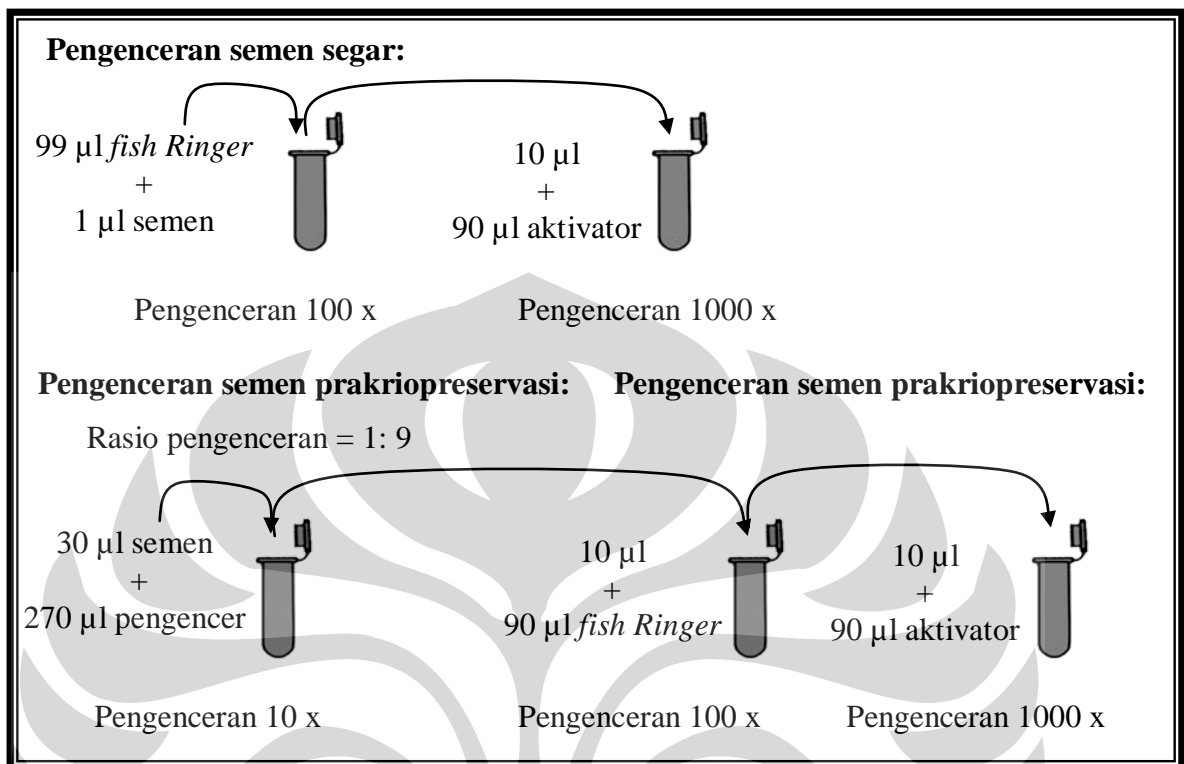
Sampel semen dianalisis sebanyak dua kali, yaitu sebelum dan setelah kriopreservasi. Analisis sebelum kriopreservasi (analisis segar) meliputi analisis makroskopik dan mikroskopik. Analisis makroskopik yang dilakukan meliputi volume, pH, dan warna semen, sedangkan analisis mikroskopik berupa persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Analisis setelah kriopreservasi (pascakriopreservasi) hanya meliputi analisis mikroskopik. Analisis mikroskopik dilakukan dengan menggunakan bantuan mikroskop trinokuler [BOECO] dan kamera *digital eye piece* [MDCE-5a] yang terhubung dengan laptop, serta dilengkapi *image driving software* [Scopephoto 2.0.4].

3.4.6.1 Analisis Volume, pH, dan Warna Semen

Volume semen diukur dengan memasukkan sampel semen ke dalam *cryotube* berskala ukur, sedangkan warna semen diamati secara fisik. Derajat keasaman (pH) ditentukan dengan menggunakan kertas pH berskala, yang selanjutnya dicocokkan dengan warna standar pH yang terdapat pada kemasan .

3.4.6.2 Penghitungan Persentase Motilitas Spermatozoa

Pengenceran semen yang akan digunakan untuk penghitungan motilitas spermatozoa segar sebesar 1000 kali. Rasio pengenceran tersebut digunakan untuk memudahkan pengamatan spermatozoa ikan tawes. Hal tersebut didasarkan pada hasil prapenelitian yang menunjukkan bahwa penggunaan rasio pengenceran yang kecil (misalnya, 50 kali) menyulitkan pengamatan spermatozoa ikan tawes. Pengenceran 1000 kali didapatkan melalui dua kali tahap pengenceran. Tahap pertama dilakukan dengan cara mengencerkan semen dengan larutan *fish ringer* hingga 100 kali, dengan perbandingan 1 : 99 (semen: larutan *fish ringer*). Selanjutnya, sebanyak 10 μ l semen hasil pengenceran 100 kali diencerkan kembali dengan larutan aktivator hingga diperoleh pengenceran 1000 kali. Rasio pengenceran kedua adalah 1 : 9 (semen: larutan aktivator). Penghitungan motilitas spermatozoa pascakriopreservasi dilakukan dengan menggunakan rasio pengenceran yang sama, yaitu 1000 kali. Sebanyak 10 μ l semen hasil pengenceran 10 kali (pengenceran untuk kriopreservasi) dicampurkan ke dalam 90 μ l larutan *fish ringer*. Selanjutnya, sebanyak 10 μ l semen hasil pengenceran dengan larutan *fish ringer* dicampurkan dengan 90 μ l larutan aktivator.

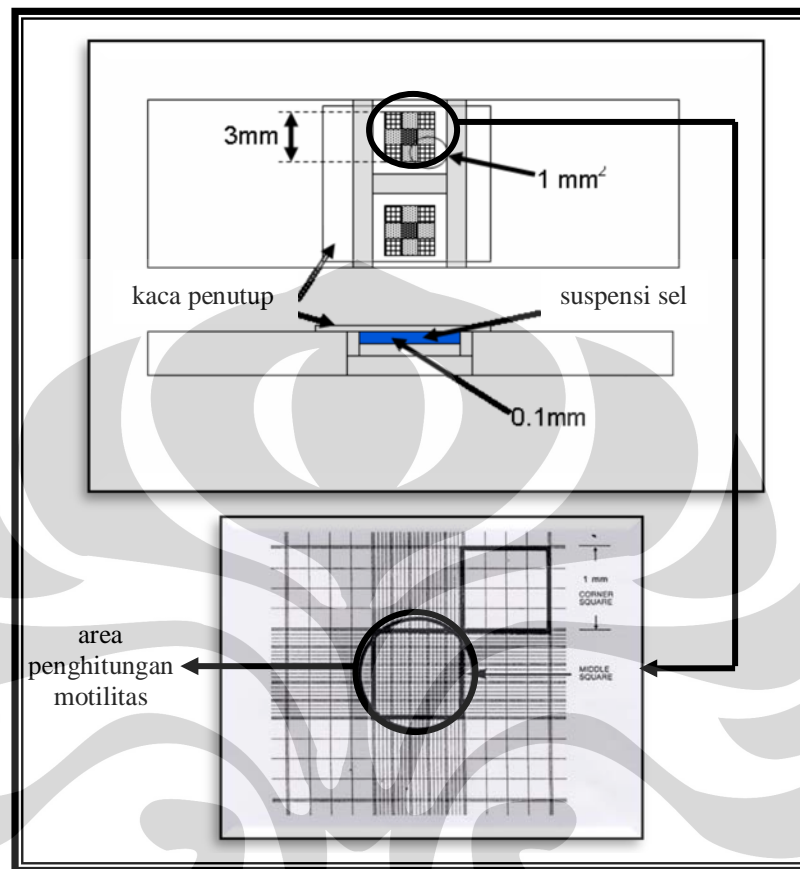


Gambar 3.2. Skema pengenceran

Sebanyak 10 µl semen yang telah diencerkan, kemudian ditetaskan pada kamar hitung *improved Neubauer* dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Pengamatan hanya dilakukan pada satu daerah R yang terdapat pada kamar hitung *improved Neubauer*. Penghitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah spermatozoa yang motil (bergerak) dan spermatozoa total. Rumus penghitungan persentase motilitas sebagai berikut:

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

(He & Woods III 2004: 679)



Gambar 3.3. Penghitungan motilitas dengan kamar hitung [Sumber: HPA 2010: 1.]

3.4.6.3 Penghitungan Persentase Viabilitas Spermatozoa

Penghitungan viabilitas spermatozoa dilakukan berdasarkan metode Salisbury & VanDemark (1985: 466). Sebanyak 10 μ l semen hasil pengenceran 1000 kali ditetaskan di atas kaca objek dan dicampur dengan 10 μ l larutan eosin-Y 0,5%, lalu ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Spermatozoa hidup tidak akan terwarnai oleh larutan eosin-Y 0,5%, sedangkan spermatozoa yang mati akan tampak berwarna merah karena telah terwarnai. Spermatozoa yang diamati sebanyak 100 sel. Rumus penghitungan persentase viabilitas sebagai berikut:

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

3.4.6.4 Penghitungan Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Penghitungan abnormalitas spermatozoa dilakukan berdasarkan metode Salisbury & VanDemark (1985: 488), yaitu dengan menggunakan preparat ulas. Sebanyak 10 μ l semen hasil pengenceran 1000 kali ditetaskan di atas kaca objek dan dibuat preparat ulas. Selanjutnya, sediaan tersebut dikeringanginkan dan difiksasi dengan menggunakan metanol selama 3 menit. Sediaan diwarnai dengan cara merendam dalam larutan Giemsa selama 30 menit, kemudian dicuci dengan air kran yang mengalir dan dikeringanginkan. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Spermatozoa yang diamati sebanyak 100 sel. Rumus penghitungan persentase viabilitas sebagai berikut:

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

3.4.7 Fertilisasi Ikan Tawes

Fertilisasi dilakukan melalui beberapa tahapan. Pertama, sebanyak 20--25 telur dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi 20 ml air kolam. Selanjutnya, sebanyak 200 μ l semen segar dan pascakriopreservasi dimasukkan ke dalam cawan petri. Campuran tersebut digoyangkan perlahan (hati-hati) selama beberapa detik. Telur kemudian dibilas dengan hati-hati menggunakan akuabides sebanyak 2--3 kali (modifikasi He & Woods III 2004: 680). Telur tersebut selanjutnya diinkubasi selama 10 menit dan diamati banyaknya telur yang telah terbuahi. Sel telur yang berhasil terbuahi ditunjukkan dengan adanya pembelahan

sel. Pengamatan sel yang berhasil dibuahi hanya dilakukan hingga tahap pembelahan empat sel. Hal tersebut dikarenakan setelah tahap pembelahan empat sel, sel telur cenderung mengalami kerusakan (selnya pecah). Fertilitas telur dihitung dengan cara membandingkan jumlah telur yang dibuahi dengan jumlah telur seluruhnya, kemudian dinyatakan dalam persen menurut rumus:

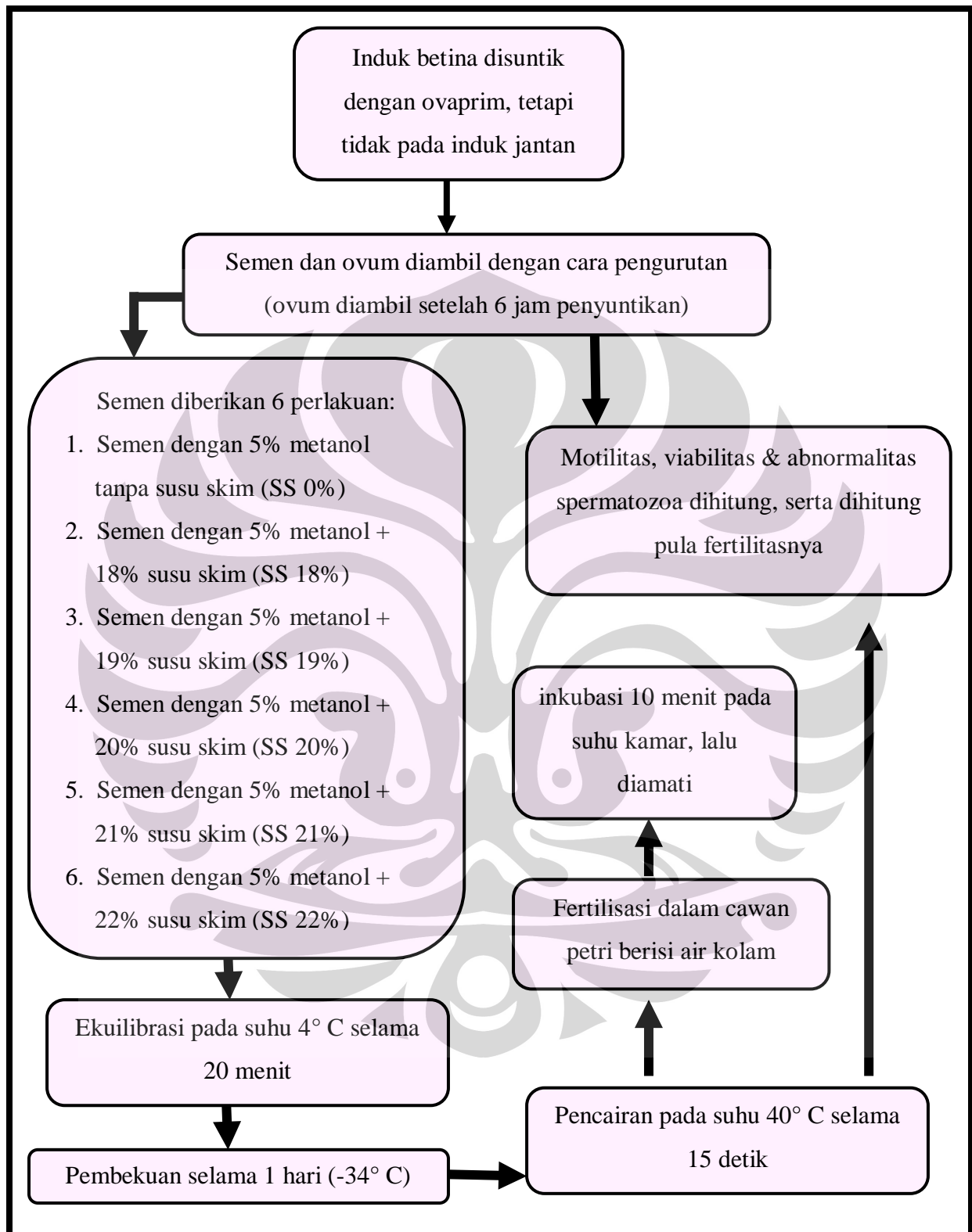
$$\% \text{ fertilitas} = \frac{\sum \text{ sel telur terbuahi}}{\sum \text{ sel telur total}} \times 100\% \quad (3.4)$$

(Yustina *dkk.* 2003: 129).

3.4.8 Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian berupa data evaluasi semen segar (volume, warna, dan pH semen), data analisis spermatozoa segar (persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas), data analisis spermatozoa pascakriopreservasi, dan data analisis fertilisasi. Data-data tersebut ditabulasikan, kemudian dianalisis. Analisis statistik dilakukan terhadap data analisis spermatozoa pascakriopreservasi dan data fertilisasi. Data yang dianalisis secara statistik harus memenuhi persyaratan statistika parametrik sehingga dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Data diuji normalitasnya dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk, sedangkan uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan uji Levene (Zar 1974: 131; Bryman & Cramer 2005: 184).

Data yang tidak normal dan tidak homogen ditransformasi. Data yang setelah ditransformasi tetap tidak normal dan tidak homogen, kemudian dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis yang dilanjutkan dengan uji Dunnet. Uji Kruskal-Wallis dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nilai rata-rata pada data kualitas spermatozoa, sedangkan uji Dunnet dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antarperlakuan (Zar 1974: 140, 141, 158, & 182). Analisis statistik pada data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for Windows*, sedangkan transformasi dan interpretasi data ke dalam bentuk diagram dilakukan dengan menggunakan program *Microsoft Office Excel 2007*.



Gambar 3.4. Skema kerja penelitian

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Evaluasi Semen Ikan Tawes

4.1.1 Volume, Warna, dan pH Semen

Volume semen segar ikan tawes yang didapatkan selama penelitian berkisar antara 0,6--0,8 ml, dengan rata-rata volumenya sebesar $0,72 \pm 0,11$ ml per individu (Tabel 4.1). Volume rata-rata semen ikan tawes yang didapatkan jauh lebih sedikit dibandingkan volume semen rata-rata ikan *family* Cyprinidae lainnya. Penelitian yang dilakukan Horvath *dkk.* (2003: 457--458) menyatakan bahwa volume semen ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang didapatkan sebesar 15 ml per individu. Bozkurt & Secer (2005: 209) menyebutkan bahwa rata-rata volume semen ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diperoleh sekitar $8,95 \pm 12,95$ ml. Penelitian Sunarma (2007: 33) melaporkan bahwa volume semen ikan nilam (*Osteochilus hasseltii*) yang diperoleh dalam penelitiannya sebesar 4 ml, yang berasal dari dua individu. Perbedaan hasil yang diperoleh dalam penelitian dengan studi yang telah dilakukan oleh Horvath *dkk.* (2003), Bozkurt & Secer (2005), dan Sunarma (2007) dapat terjadi karena perbedaan prosedur kerja yang dilakukan. Ketiga studi tersebut memberikan rangsangan hormon (hipofisasi) sebelum pengambilan sampel semen, sedangkan dalam penelitian tidak dilakukan induksi hormon terlebih dahulu. Menurut Fujaya (2002: 77), hipofisasi dilakukan untuk mempercepat kematangan gonad atau merangsang hewan yang telah matang kelamin untuk memijah, sehingga dapat diperoleh semen dengan jumlah yang banyak.

Perbedaan volume semen juga dapat disebabkan oleh perbedaan spesies dan individu. Penelitian Horvath *dkk.* (2003) dan Bozkurt & Secer (2005) menggunakan spesies ikan yang sama, yaitu ikan mas (*Cyprinus carpio*). Namun demikian, dari kedua studi tersebut diperoleh volume semen yang berbeda. Hal tersebut menunjukkan bahwa meskipun spesies ikan yang digunakan sama, tetapi dapat terjadi perbedaan jumlah volume semen yang diperoleh. Routray *dkk.*

(2007: 3) menyatakan bahwa variasi volume semen yang dihasilkan dalam satu spesies dapat terjadi karena dipengaruhi oleh faktor bobot dan siklus reproduksi tiap organisme. Perbedaan jumlah volume semen juga dapat disebabkan oleh faktor perbedaan kondisi pakan, faktor lingkungan, dan waktu pemijahan (Bozkurt & Secer 2005: 209). Semen yang diperoleh selama penelitian berwarna putih susu (Tabel 4.1). Warna semen tersebut sesuai dengan hasil penelitian Zuraida pada tahun 2009. Zuraida (2009: 47) menyebutkan bahwa warna semen ikan tawes yang teramati adalah putih susu atau putih santan.

Derajat keasaman (pH) semen ikan tawes yang terukur selama penelitian rata-rata sebesar $7,98 \pm 0,11$ (Tabel 4.1). Nilai pH tersebut berbeda dengan nilai pH yang diperoleh Zuraida (2009: 46) yang melaporkan bahwa rerata nilai pH yang diperoleh sebesar $7,03 \pm 0,15$. Perbedaan nilai pH yang diperoleh menunjukkan bahwa variasi nilai pH juga dapat terjadi dalam spesies yang sama. Penelitian lain juga menunjukkan hasil yang serupa. Penelitian Bozkurt & Secer (2005: 209) menggunakan spesies ikan mas menyebutkan bahwa nilai rerata pH yang diperoleh sebesar $7,15 \pm 0,35$. Penelitian yang dilakukan oleh Bozkurt *dkk.* (2009: 2746) melaporkan bahwa nilai pH ikan mas yang didapatkan adalah $7,59 \pm 0,74$.

4.2 Analisis Spermatozoa Ikan Tawes Segar (Prakriopreservasi)

4.2.1 Persentase Motilitas Spermatozoa

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan nilai persentase rata-rata motilitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi) sebesar $80,75 \pm 1,21\%$ (Tabel 4.1). Menurut Bozkurt & Secer (2005: 208), sampel dengan persentase motilitas lebih dari 70% dapat digunakan untuk penyimpanan spermatozoa jangka pendek. Nilai persentase motilitas yang diperoleh menunjukkan bahwa spermatozoa yang dihasilkan berkualitas baik dan dapat dikriopreservasi. Nilai rerata persentase motiitas yang diperoleh tidak berbeda jauh dengan hasil yang didapatkan oleh Zuraida (2009: 47), yaitu sebesar $81,36 \pm 6,07\%$.

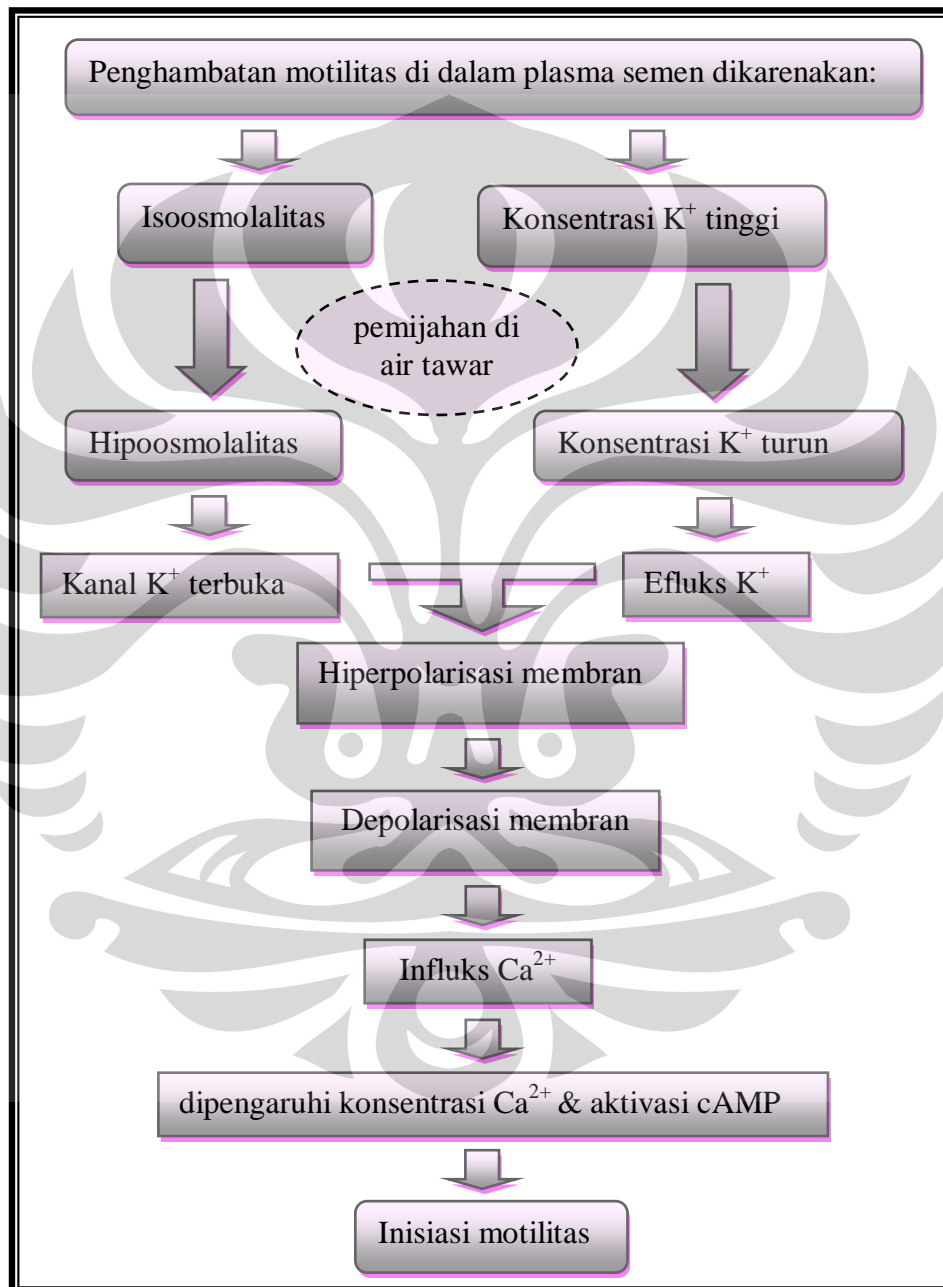
Menurut Bozkurt (2006: 284), motilitas spermatozoa ikan dapat berbeda, meskipun berasal dari spesies ataupun individu yang sama. Hal tersebut dikarenakan kualitas spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya usia, ukuran, dan fisiologis ikan. Nilai motilitas yang berbeda juga dapat disebabkan oleh metode pengamatan yang digunakan. Metode pengamatan yang digunakan dalam penelitian adalah metode subjektif. Oleh karena itu, perbedaan dalam interpretasi data yang diperoleh sangat mungkin terjadi dikarenakan faktor subjektivitas dan pengalaman peneliti (Rurangwa *dkk.* 2004: 10).

Pengamatan motilitas spermatozoa ikan tawes dilakukan dengan menggunakan kamar hitung *improved Neubauer* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Penentuan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara menghitung spermatozoa yang bergerak, baik bergerak lurus dan cepat, bergerak lurus tetapi lambat, bergerak tidak lurus, bergerak lambat, dan tidak bergerak (Čipak *dkk.* 2009: 88).

Motilitas spermatozoa diinduksi dengan menggunakan larutan aktivator. Komposisi larutan aktivator yang digunakan, yaitu 45 mM NaCl (0,26 g NaCl), 5 mM KCl (0,037 g KCl), dan 30 mM Tris (0,36 g C₄H₁₁NO₃) (Sunarma 2007: 33). Nilai osmolalitas larutan aktivator tersebut lebih rendah (< 160 mOsm per kg) dibandingkan nilai osmolalitas plasma semen ikan (240--380 mOsm per kg) (Perchech *dkk.* 1995: 748). Penambahan larutan aktivator menyebabkan terjadinya perubahan nilai osmolalitas, sehingga menginduksi pergerakan spermatozoa.

Pergerakan spermatozoa terjadi akibat adanya perubahan nilai osmolalitas dalam plasma semen. Perubahan nilai osmolalitas terjadi akibat penambahan larutan aktivator yang memiliki nilai osmolalitas yang lebih rendah. Perubahan nilai osmolalitas dapat terjadi karena kondisi plasma semen berubah dari yang semula isotonis menjadi hipotonis. Hal tersebut mengakibatkan komposisi ion dalam spermatozoa menjadi tidak seimbang. Ketidakseimbangan komposisi ion mendorong terjadinya efluks K⁺ dan menyebabkan terbukanya kanal ion K⁺ pada membran sel spermatozoa. Efluks yang terjadi menyebabkan hiperpolarisasi pada membran. Hiperpolarisasi tersebut mengakibatkan perbedaan keelektronegatifan antara cairan intraseluler dan ekstraseluler meningkat, sehingga cairan intraseluler menjadi lebih negatif. Kondisi demikian mendorong membran sel melakukan

depolarisasi melalui proses influks Ca^{2+} , sehingga konsentrasi ion Ca^{2+} bertambah. Kondisi yang terjadi menyebabkan teraktivasinya adenil siklase. Adenil siklase kemudian mengubah ATP menjadi cAMP, sehingga konsentrasi cAMP meningkat. Peningkatan konsentrasi cAMP mendorong pengaktifan aksonema, sehingga spermatozoa dapat bergerak (Alavi & Cosson 2006: 5).

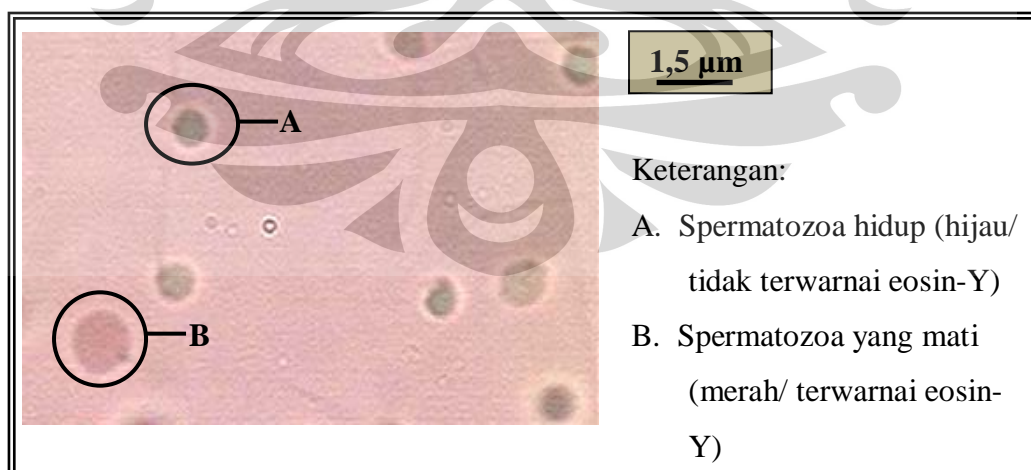


Gambar 4.1. Skema inisiasi motilitas spermatozoa ikan air tawar [Sumber: Alavi & Cosson 2006: 5.]

4.2.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa

Nilai rerata persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi) yang didapatkan adalah $82,40 \pm 1,34$ (Tabel 4.1.). Berdasarkan studi yang dilakukan Cabrita *dkk.* (2005: 278), diketahui bahwa nilai viabilitas spermatozoa ikan tawes yang diperoleh tergolong normal dan layak dikriopreservasi, dikarenakan nilai viabilitasnya diatas 80%. Oleh karena itu, berdasarkan data persentase viabilitas, maka dapat dilakukan kriopreservasi spermatozoa ikan tawes.

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan karena merupakan salah satu parameter kualitas spermatozoa. Pengamatan viabilitas dilakukan dengan mengamati spermatozoa yang masih hidup dan telah mati (Gambar 4.2.). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan pewarna eosin-Y. Pewarna eosin-Y merupakan zat yang bersifat asam dan dapat memberikan warna merah pada sel. Viabilitas spermatozoa berkaitan dengan daya permeabilitas dan integritas membran sel. Pewarna eosin-Y dapat dengan mudah masuk ke dalam sel yang telah mati, sehingga sel akan terwarnai. Pewarna eosin-Y tidak dapat masuk dan mewarnai sel yang masih hidup. Hal tersebut dikarenakan sel hidup masih memiliki kemampuan mempertahankan daya permeabilitas dan integritas membran selnya (Rurangwa *dkk.* 2004: 7).



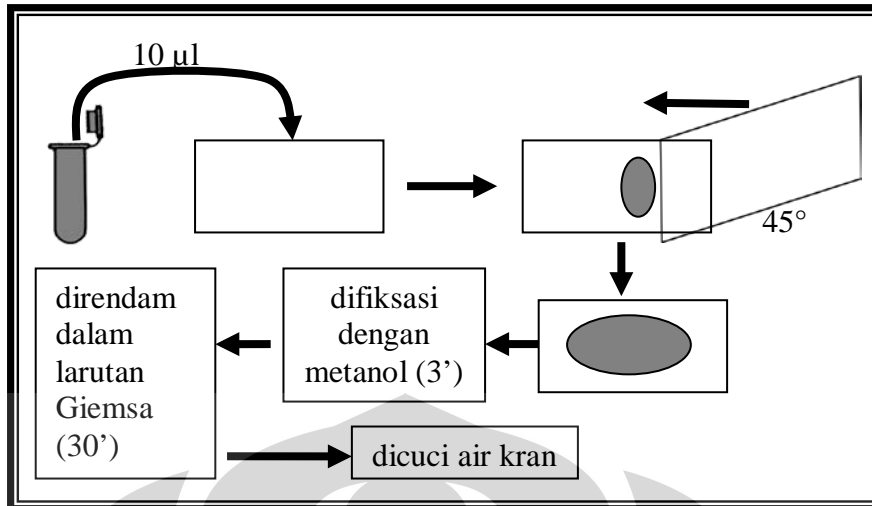
Gambar 4.2. Viabilitas pada spermatozoa ikan tawes
[Sumber: Dokumentasi Pribadi.]

4.2.3 Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi) yang didapatkan selama penelitian adalah $18,40 \pm 0,55\%$. Tabel 4.1. memperlihatkan data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi). Menurut Azizah & Arifantini (2009: 64), spermatozoa yang baik untuk dikriopreservasi memiliki nilai persentase normalitas di atas 70%. Hal tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa ikan tawes yang didapatkan layak untuk dikriopreservasi.

Nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi) yang didapatkan selama penelitian berbeda jauh dengan yang diperoleh Zuraida (2009: 50), yaitu sebesar $23,50 \pm 1,90\%$. Namun demikian, hasil penelitian yang didapatkan tidak berbeda jauh dengan penelitian Rahayu (2009: 45), yaitu sebesar 16%. Perbedaan yang terjadi menunjukkan bahwa meskipun spesies ikan yang digunakan sama, perbedaan dalam hal abnormalitas spermatozoa dapat terjadi.

Abnormalitas spermatozoa dapat terjadi akibat proses penyimpanan spermatozoa yang telah matang dalam testis. Lamanya waktu penyimpanan menyebabkan terjadinya penuaan yang berdampak pada perubahan morfologi spermatozoa (Billiard *dkk.* 1995: 97). Pengamatan abnormalitas dilakukan dengan menggunakan preparat ulas. Abnormalitas yang diamati dalam penelitian meliputi abnormalitas pada bagian kepala dan ekor. Abnormalitas pada spermatozoa dapat memengaruhi keberhasilan fertilisasi. Spermatozoa yang mengalami kelainan morfologi memiliki tingkat fertilitas yang lebih rendah dibandingkan spermatozoa normal. Kelainan yang terjadi mengakibatkan pergerakan spermatozoa menjadi tidak sempurna (Rurangwa *dkk.* 2004: 8).



Gambar 4.3. Pembuatan preparat ulas

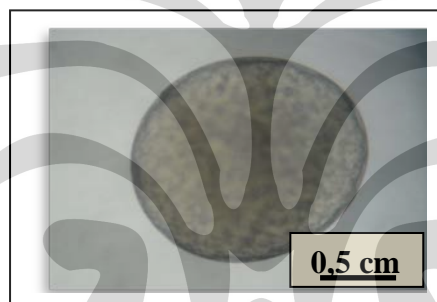
4.2.4 Persentase Fertilitas Spermatozoa

Nilai rerata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi) yang didapatkan selama penelitian adalah $83,63 \pm 1,21\%$. Tabel 4.1. memperlihatkan data rerata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi). Nilai persentase fertilitas yang diperoleh dalam penelitian lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Akhter *dkk.* (2003). Akhter *dkk.* (2003: 20) melaporkan bahwa tingkat fertilitas pada spesies *Barbodes gonionotus* strain Indonesia adalah 91,46%.

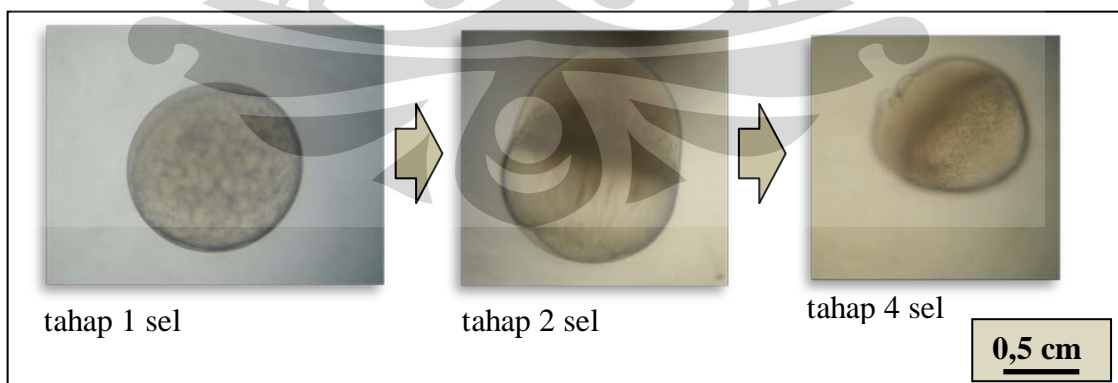
Salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan fertilisasi adalah kualitas spermatozoa (Yustina *dkk.* 2003: 130). Parameter kualitas spermatozoa yang menentukan keberhasilan fertilisasi di antaranya adalah motilitas. Studi yang dilakukan oleh Bozkurt (2006: 287) pada spesies ikan mas melaporkan bahwa terdapat korelasi positif antara motilitas dan tingkat fertilisasi. Spermatozoa yang memiliki tingkat motilitas yang tinggi dapat membuahi sel telur lebih banyak dibandingkan spermatozoa dengan motilitas yang rendah. Data penelitian yang tampak dalam Tabel 4.1. menunjukkan bahwa nilai persentase motilitas dan viabilitas yang tinggi, serta rendahnya nilai abnormalitas spermatozoa menyebabkan tingkat fertilisasi yang dihasilkan cukup besar. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara kualitas spermatozoa dengan kemampuan fertilisasi spermatozoa.

Kuantitas spermatozoa juga merupakan salah satu parameter keberhasilan fertilisasi, selain kualitas spermatozoa (Yustina *dkk.* 2003: 130),. Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh dalam penelitian rata-rata sebesar $14,62 \times 10^9$ spermatozoa per ml. Konsentrasi tersebut sudah cukup efektif digunakan dalam proses fertilisasi. Hal tersebut diketahui dari besarnya nilai persentase fertilitas yang diperoleh (Tabel 4.1.).

Fertilisasi spermatozoa ikan tawes dilakukan dalam wadah berupa cawan petri yang telah diisi dengan air kolam. Perhitungan tingkat fertilitas dilakukan dalam wadah berupa cawan petri dan diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 10×10 . Pengamatan fertilitas meliputi sel telur yang berhasil terbuahi dan tidak terbuahi. Pengamatan sel telur dilakukan 10 menit setelah pencampuran spermatozoa dengan sel telur. Gambar 4.4. dan 4.5. memperlihatkan perbedaan sel telur yang berhasil terbuahi dan tidak terbuahi.



Gambar 4.4. Sel telur ikan tawes yang tidak terbuahi
[Sumber: Dokumentasi Pribadi.]



Gambar 4.5. Perkembangan sel telur ikan tawes yang terbuahi
[Sumber: Dokumentasi Pribadi.]

Tabel 4.1. Data analisis semen dan spermatozoa segar ikan tawes

n	Makroskopik			Mikroskopik			
	Volume (ml)	pH	Warna	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	Abnormalitas (%)	Fertilitas (%)
1	0,8	7,9	putih susu	82,75	84	18	85,00
2	0,6	7,9	putih susu	79,78	83	19	85,00
3	0,6	7,9	putih susu	79,78	83	19	84,50
4	0,8	8,1	putih susu	80,73	81	18	80,00
5	0,8	8,1	putih susu	80,73	81	18	81,75
\bar{x}	0,72	7,98	putih susu	80,75	82,40	18,40	83,63
SD	0,11	0,11	-	1,21	1,34	0,55	1,21

Keterangan: n = ulangan \bar{x} = nilai rerata SD = standar deviasi

4.3 Analisis Spermatozoa Ikan Tawes Satu Hari Pascakriopreservasi

4.3.1 Persentase Motilitas Spermatozoa

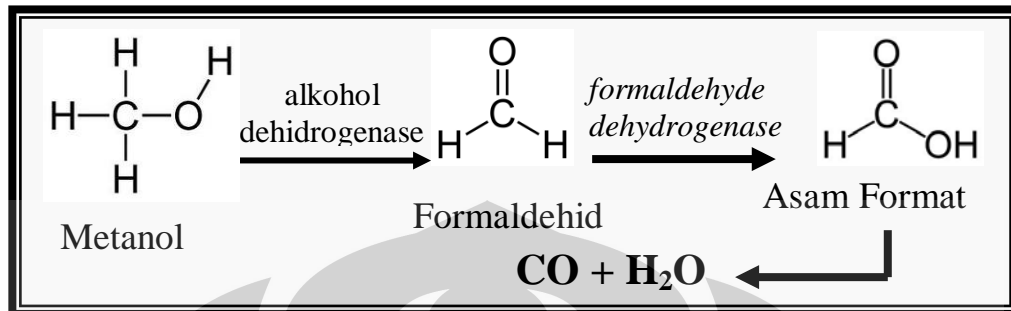
Berdasarkan hasil penelitian, nilai rerata persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tiap perlakuan adalah $15,24 \pm 1,51\%$ (SS 0%), $72,49 \pm 1,77\%$ (SS 18%), $73,14 \pm 1,05\%$ (SS 19%), $73,55 \pm 1,69\%$ (SS 20%), $72,78 \pm 1,71\%$ (SS 21%), dan $72,33 \pm 1,84\%$ (SS 22%). Data rerata persentase motilitas spermatozoa ikan tawes pascakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.2. Hasil uji Kruskal-Wallis terhadap data rerata persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi menunjukkan bahwa penggunaan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata ($P < 0,05$) (Lampiran 4). Pengujian lanjutan dengan uji perbandingan berganda Dunnet menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata antarperlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% (Lampiran 5).

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa penggunaan susu skim sebagai krioprotektan memberikan pengaruh dalam perlindungan spermatozoa selama kriopreservasi dibandingkan perlakuan tanpa susu skim. Hasil uji terhadap data penelitian menunjukkan bahwa penggunaan susu skim 18% memberikan perlindungan yang sama baiknya terhadap motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi. Susu skim 18% dianggap lebih efisien digunakan dalam kriopreservasi spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi. Hal tersebut dikarenakan penggunaan susu skim dengan konsentrasi lebih rendah dapat memberikan perlindungan yang sama baiknya dengan penggunaan konsentrasi yang lebih tinggi.

Nilai persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi terendah ditunjukkan oleh konsentrasi susu skim 0% (tanpa pemberian susu skim). Hal tersebut menunjukkan bahwa susu skim yang digunakan dalam penelitian bekerja dengan baik sebagai krioprotektan spermatozoa ikan tawes. Susu skim digunakan dalam penelitian karena dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler. Susu skim dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan sel akibat pembentukan kristal es ekstraseluler (Singsee *dkk.* 2005: 207). Metanol yang digunakan dalam penelitian juga berperan penting dalam melindungi spermatozoa selama kriopreservasi. Menurut Jensen *dkk.* (2008: 41), penggunaan metanol lebih efektif dibandingkan krioprotektan lain, seperti DMSO, gliserol, campuran DMSO-gliserol, 1,2 propanediol, ataupun N-N-dimetil asetamida pada spesies ikan Salmonidae.

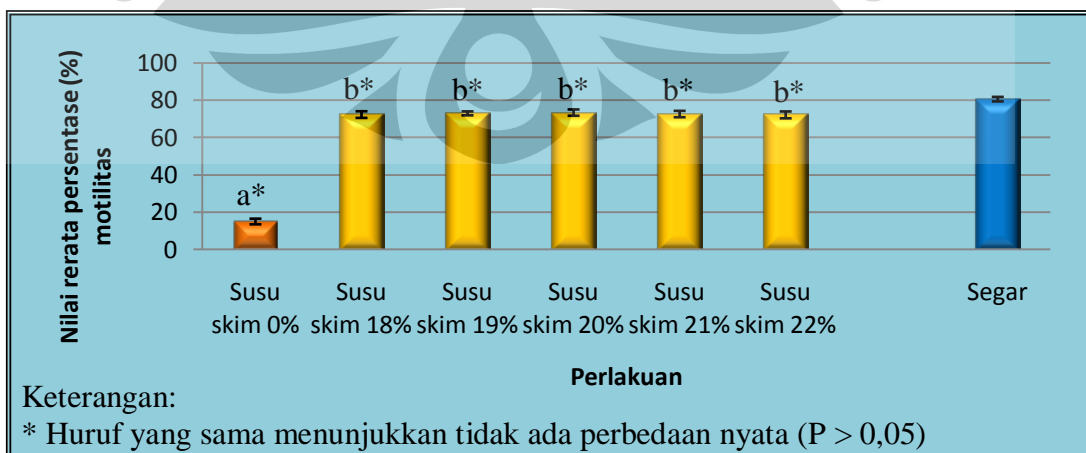
Data hasil penelitian (Tabel 4.2) menunjukkan adanya penurunan nilai rerata persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dibandingkan spermatozoa segar. Penurunan tersebut dapat disebabkan oleh toksisitas metanol. Toksisitas metanol terjadi karena adanya metabolisme metanol pada saat ekuilibriasi dan pascapencairan. Metabolisme metanol terjadi karena adanya enzim alkohol dehidrogenase yang mengubah metanol menjadi formaldehid. Suhu selama ekuilibriasi dan pascapencairan diduga merupakan suhu yang sesuai bagi kerja enzim. Formaldehid yang terbentuk kemudian diubah menjadi asam format oleh enzim *formaldehyde dehydrogenase* (Gambar 4.6). Asam format yang terbentuk bersifat racun dan mengurangi motilitas spermatozoa

(Timbrell 2008: 385). Penurunan nilai motilitas juga dapat disebabkan oleh faktor susu skim yang digunakan. Laktenin yang terkandung dalam susu bersifat racun bagi spermatozoa (Salisbury & VanDemark 1985: 589).



Gambar 4.6. Proses metabolisme metanol
[Sumber: Brandis 2010: 1.]

Prosedur penelitian yang dilakukan berupaya untuk mengurangi toksisitas senyawa yang digunakan, di antaranya dengan melakukan pemanasan susu skim. Pemanasan susu skim selama 1 menit pada suhu 87--90° C bertujuan untuk mengurangi atau menghilangkan toksisitas laktenin. Proses pemanasan dapat menyebabkan denaturasi protein serum akibat teraktivasi enzim dalam susu. Denaturasi protein dapat menghasilkan asam amino sistein yang dapat menetralkan toksisitas laktenin (Salisbury & VanDemark 1985: 588). Sistein juga dapat menyebabkan terinaktivasi formaldehid yang terbentuk dalam metabolisme metanol. Sistein dapat mengikat formaldehid sehingga mencegah pembentukan asam format yang beracun bagi spermatozoa (Salaspuro 2007: 146--147).



Gambar 4.7. Diagram nilai rerata persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

4.3.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa

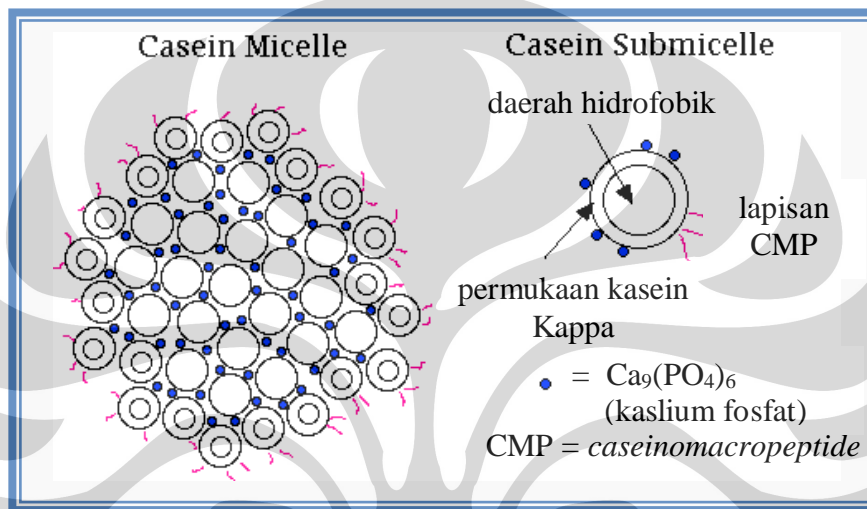
Data nilai rerata persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.2. Berdasarkan Tabel 4.2., diketahui bahwa nilai rerata persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi untuk tiap perlakuan adalah $48,20 \pm 1,79\%$ (SS 0%), $68,80 \pm 1,30\%$ (SS 18%), $70,20 \pm 1,30\%$ (SS 19%), $71,60 \pm 1,14\%$ (SS 20%), $68,60 \pm 1,34\%$ (SS 21%), dan $70,20 \pm 0,84\%$ (SS 22%). Hasil uji Kruskal-Wallis terhadap data nilai rerata persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata antara kontrol (susu skim 0%) dan perlakuan susu skim konsentrasi 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% ($P < 0,05$) (Lampiran 4). Uji lanjutan berupa uji perbandingan berganda Dunnet menunjukkan adanya perbedaan antarperlakuan susu skim konsentrasi 0% (kontrol) dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% (Lampiran 5).

Penurunan nilai rerata persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dibandingkan spermatozoa segar (prakriopreservasi) dapat disebabkan proses kriopreservasi yang dilakukan. Teknik kriopreservasi menyebabkan terjadinya kerusakan spermatozoa selama pembekuan dan pencairan. Menurut Horváth *dkk.* (2007: 252), kriopreservasi mengakibatkan terjadinya perubahan integritas membran sel, kerusakan organ seluler, dan hilangnya integritas DNA dalam spermatozoa. Kerusakan sel dapat diminimalkan dengan penggunaan krioprotektan. Krioprotektan berperan melindungi membran plasma dari terjadinya disorganisasi selama pembekuan (Lessard *dkk.* 2000: 700).

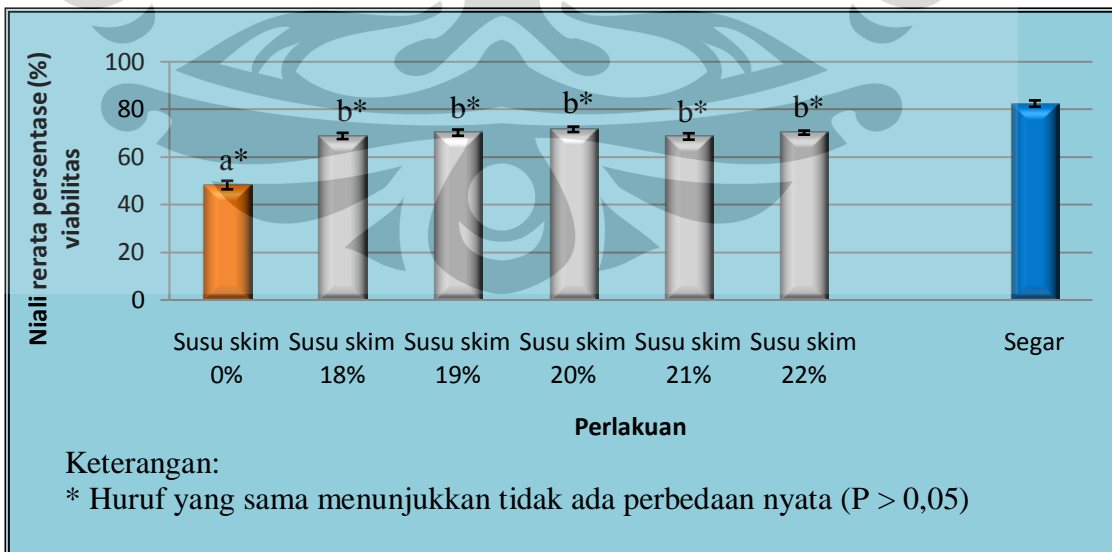
Penggunaan campuran metanol dan susu skim sebagai krioprotektan berperan penting dalam meminimalkan terjadinya kerusakan sel selama kriopreservasi. Metanol sebagai krioprotektan intraseluler dan susu skim sebagai krioprotektan ekstraseluler bekerja sama dalam mekanisme perlindungan spermatozoa. Harvey (1983: 315) menyatakan bahwa interaksi antara dua jenis krioprotektan (metanol dan susu skim) bekerja saling melengkapi sebagai komponen pelindung spermatozoa. Kombinasi krioprotektan tersebut merupakan kombinasi krioprotektan yang baik.

Mekanisme perlindungan susu skim dilakukan dengan cara memberikan lapisan pelindung terhadap membran sel (*membrane coating*) (Arifiantini *dkk.*

2005: 367). Mekanisme pelapisan membran sel terjadi akibat pengikatan protein susu (terutama kasein) pada permukaan membran sel. Kasein dapat berikatan karena merupakan protein konjugat yang mudah berikatan dengan senyawa lain. Kasein tersebut akan berkumpul dan teragregasi, sehingga lapisan kasein yang terbentuk akan semakin rapat dan kuat dalam melindungi membran sel (Goff 1995: 8). Mekanisme lapisan pelindung membran sel tersebut dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan sel selama kriopreservasi.



Gambar 4.8. Struktur *casein micelle* dan *submicelle*
[Sumber: Goff 1995: 2.]



Gambar 4.9. Diagram nilai rerata persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

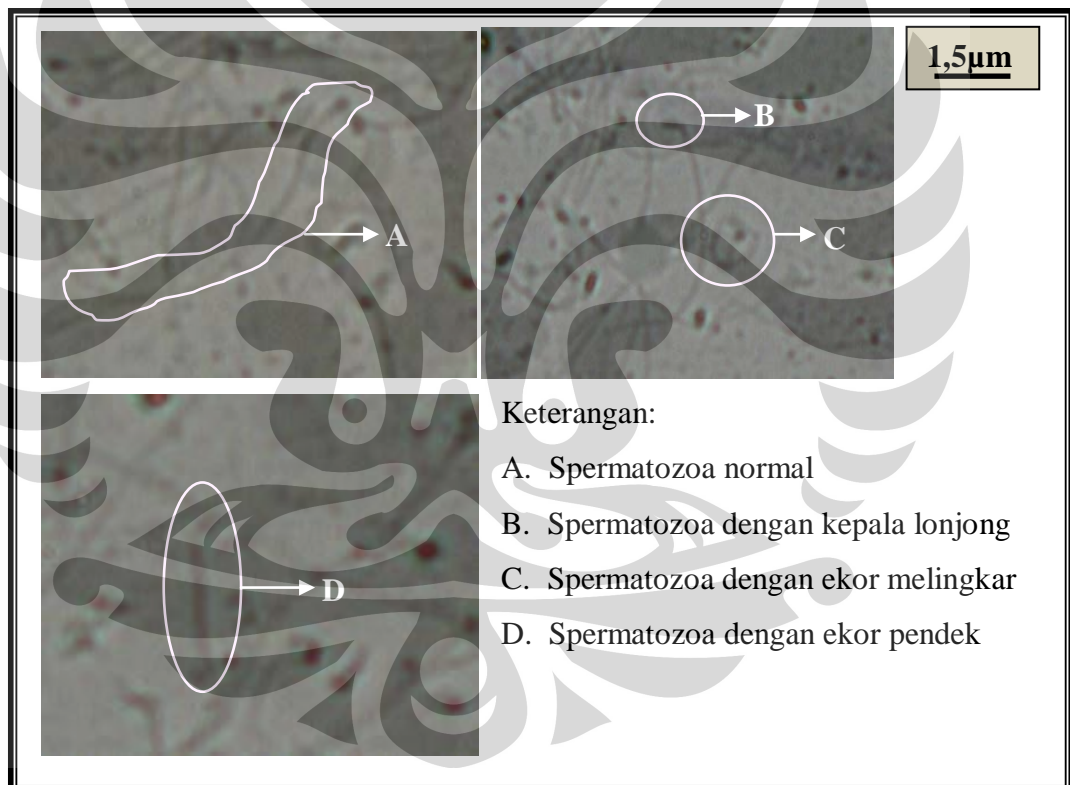
4.3.3 Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Data nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.2. Berdasarkan Tabel 4.2., diketahui bahwa nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi untuk tiap perlakuan adalah $37,50 \pm 1,87\%$ (SS 0%), $26,00 \pm 1,40\%$ (SS 18%), $24,17 \pm 1,20\%$ (SS 19%), $22,67 \pm 0,82\%$ (SS 20%), $23,33 \pm 1,03\%$ (SS 21%), dan $25,33 \pm 2,16\%$ (SS 22%). Hasil uji Kruskal-Wallis terhadap data nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata antara kontrol (susu skim 0%) dengan perlakuan susu skim konsentrasi 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% ($P < 0,05$) (Lampiran 4). Uji lanjutan berupa uji perbandingan berganda Dunnett menunjukkan adanya perbedaan antarperlakuan susu skim 0% dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%, serta antarperlakuan susu skim konsentrasi 18% dengan 20% dan 21% (Lampiran 5).

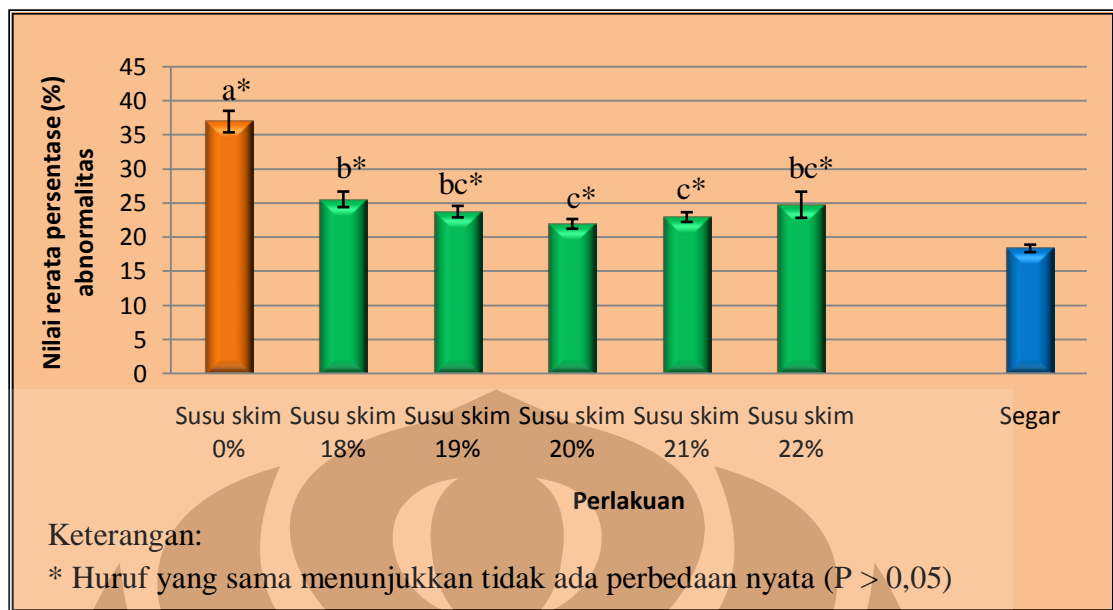
Data penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa perlakuan 0% (tanpa pemberian susu skim) memberikan nilai tertinggi dalam persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes. Hal tersebut mengindikasikan bahwa perlakuan tanpa pemberian susu skim menyebabkan abnormalitas spermatozoa ikan tawes lebih besar dibandingkan perlakuan dengan penambahan susu skim. Konsentrasi susu skim 18% yang digunakan bekerja lebih efisien dalam melindungi spermatozoa selama kriopreservasi. Hal tersebut didasarkan pada hasil penelitian yang menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi susu skim yang lebih rendah (18%) dapat memberikan perlindungan yang sama baiknya dibandingkan penggunaan konsentrasi susu skim yang lebih besar (19%, 20%, 21%, dan 22%).

Bentuk abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi yang teramati selama penelitian tidak berbeda dengan pengamatan abnormalitas pada spermatozoa ikan tawes segar (prakriopreservasi). Bentuk abnormalitas yang teramati meliputi abnormalitas pada bagian kepala dan ekor. Bentuk abnormalitas yang teramati, yaitu bentuk kepala yang lonjong, ekor yang pendek dan melingkar (Gambar 4.10.). Abnormalitas pada bagian kepala biasanya diakibatkan adanya perbedaan tekanan osmotik selama kriopreservasi, yaitu antara

cairan intraseluler dan ekstraseluler. Perbedaan tekanan osmotik dapat terjadi dikarenakan proses kriopreservasi berlangsung secara tidak sempurna. Abnormalitas pada bagian ekor terjadi akibat perubahan fisikokimiawi, sehingga memengaruhi bentuk ekor dari spermatozoa. Perubahan fisikokimiawi yang terjadi selama kriopreservasi meliputi perubahan suhu yang ekstrem, proses dehidrasi, dan rehidrasi. Perubahan fisikokimiawi tersebut menyebabkan terjadinya kerusakan sel (Muchlisin 2005: 12 & 15). Penambahan campuran metanol dan susu skim diketahui dapat meminimalisir abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi. Hal tersebut ditunjukkan dari nilai persentase abnormalitas spermatozoa yang lebih rendah pada perlakuan dengan penambahan susu skim dibandingkan tanpa susu skim.



Gambar 4.10. Morfologi spermatozoa
[Sumber: Dokumentasi Pribadi.]



Gambar 4.11. Diagram nilai rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

4.3.4 Persentase Fertilitas Spermatozoa

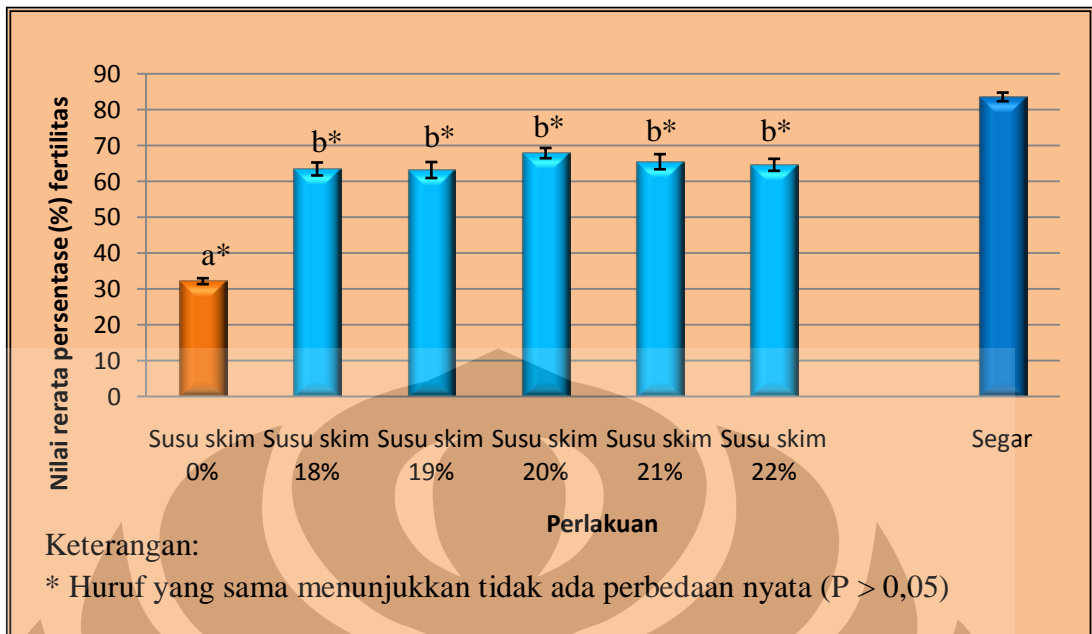
Data nilai rerata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dapat dilihat pada Tabel 4.2. Berdasarkan Tabel 4.2., diketahui bahwa nilai rerata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi untuk tiap perlakuan adalah $32,26 \pm 0,83\%$ (SS 0%), $63,55 \pm 1,81\%$ (SS 18%), $63,25 \pm 2,23\%$ (SS 19%), $67,97 \pm 1,43\%$ (SS 20%), $65,57 \pm 2,10\%$ (SS 21%), dan $64,70 \pm 1,67\%$ (SS 22%). Hasil uji Kruskal-Wallis terhadap data nilai rata-rata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata antara kontrol (susu skim) dan perlakuan konsentrasi susu skim 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% ($P < 0,05$) (Lampiran 4). Uji lanjutan berupa uji perbandingan berganda Dunnet menunjukkan adanya perbedaan antarperlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% (Lampiran 5).

Fertilisasi spermatozoa pascakriopreservasi dilakukan segera setelah sel telur dikoleksi dan spermatozoa dicairkan. Pencampuran yang segera dilakukan juga mencegah tertutupnya mikrofil pada sel telur (Leung & Jamieson 1991: 251).

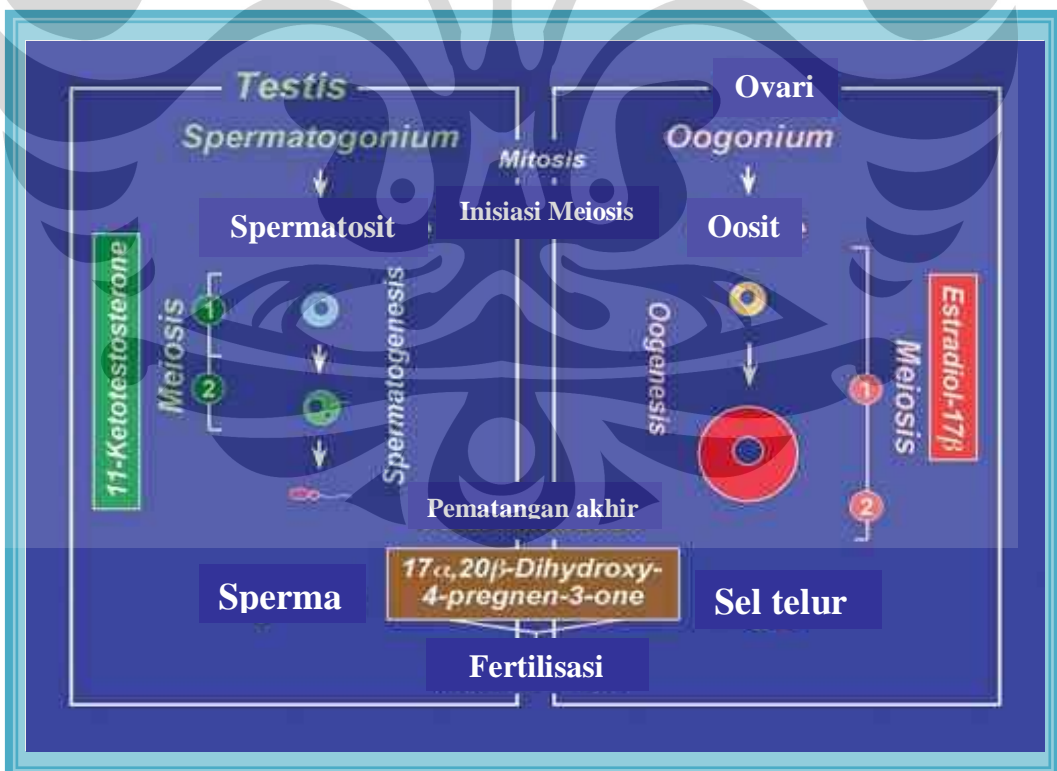
Müller *dkk.* (2008: 391) menyatakan bahwa proses fertilisasi terjadi melalui mikropil yang menyebabkan sperma dapat melewati selaput sel telur (korion).

Nilai rerata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi jauh lebih rendah dibandingkan fertilisasi segar. Hasil yang diperoleh sesuai dengan pernyataan Hiemstra *dkk.* (2005: 27) bahwa pada sebagian besar spesies tingkat fertilisasi semen pascakriopreservasi lebih rendah daripada fertilisasi semen segar. Data persentase fertilitas yang diperoleh (Tabel 4.2.) menunjukkan adanya korelasi positif antara kualitas spermatozoa dengan tingkat fertilisasi. Kualitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi lebih rendah dibandingkan spermatozoa segar. Kualitas spermatozoa yang rendah menyebabkan tingkat keberhasilan fertilisasi juga rendah. Keberhasilan fertilisasi juga dipengaruhi faktor lain, selain kualitas spermatozoa, di antaranya rasio pengenceran, jenis ekstender, dan kualitas sel telur (Bozkurt & Secer 2005: 209).

Penggunaan campuran metanol dan susu skim diketahui memengaruhi kualitas spermatozoa ikan tawes, yang berkorelasi dengan kemampuan spermatozoa membuahi sel telur. Hal tersebut didasarkan pada hasil yang diperoleh selama penelitian (Tabel 4.2.). Data persentase fertilitas yang diperoleh menunjukkan bahwa spermatozoa yang tidak ditambahkan susu skim (SS 0%) memberikan hasil yang paling rendah dibandingkan yang ditambahkan susu skim (SS 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%). Spermatozoa yang tidak ditambahkan susu skim menghasilkan nilai motilitas dan viabilitas yang sangat rendah, serta nilai abnormalitas yang sangat besar. Hal tersebut kemungkinan yang menyebabkan tingkat fertilitas yang dihasilkan sangat rendah. Penggunaan campuran metanol dan berbagai konsentrasi susu skim (18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) menunjukkan bahwa campuran tersebut merupakan kombinasi yang baik dalam mempertahankan kemampuan spermatozoa membuahi sel telur.



Gambar 4.12. Diagram nilai rerata persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi



Gambar 4.13. Regulasi hormon dalam gametogenesis ikan [Sumber: NIBB 2004: 1.]

Tabel 4.2. Data rerata persentase \pm standar deviasi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa segar ikan tawes (prakriopreservasi) dan satu hari pascakriopreservasi

Tahap kriopreservasi	Perlakuan	Motilitas (%)	Viabilitas (%)
Segar (prakriopreservasi)	-	80,75 \pm 1,21	82,40 \pm 1,34
Pascakriopreservasi	Susu skim 0%	15,24 \pm 1,51 (a*)	48,20 \pm 1,79% (a*)
	Susu skim 18%	72,49 \pm 1,77% (b*)	68,80 \pm 1,30% (b*)
	Susu skim 19%	73,14 \pm 1,05% (b*)	70,20 \pm 1,30% (b*)
	Susu skim 20%	73,55 \pm 1,69% (b*)	71,60 \pm 1,14% (b*)
	Susu skim 21%	72,78 \pm 1,71% (b*)	68,60 \pm 1,34% (b*)
	Susu skim 22%	72,33 \pm 1,84% (b*)	70,20 \pm 0,84% (b*)
Tahap kriopreservasi	Perlakuan	Abnormalitas (%)	Fertilitas (%)
Segar (prakriopreservasi)	-	18,40 \pm 0,55	83,63 \pm 1,21
Pascakriopreservasi	Susu skim 0%	37,50 \pm 1,87% (a*)	32,26 \pm 0,83% (a*)
	Susu skim 18%	26,00 \pm 1,40% (b*)	63,55 \pm 1,81% (b*)
	Susu skim 19%	24,17 \pm 1,20% (bc*)	63,25 \pm 2,23% (b*)
	Susu skim 20%	22,67 \pm 0,82% (c*)	67,97 \pm 1,43% (b*)
	Susu skim 21%	23,33 \pm 1,03% (c*)	65,57 \pm 2,10% (b*)
	Susu skim 22%	25,33 \pm 2,16% (bc*)	64,70 \pm 1,67% (b*)

Tabel 4.3. Data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

n	Motilitas (%)						Viabilitas (%)					
	Susu skim						Susu skim					
	0%	18%	19%	20%	21%	22%	0%	18%	19%	20%	21%	22%
1	13,33	70	72	72,46	73,71	73,08	47	70	72	71	68	71
2	14,08	74,03	72,98	76,0	72,4	70,31	50	69	69	72	70	69
3	16,00	72,01	72	73,2	73,4	73,68	46	70	71	70	70	70
4	17,08	74,37	74,63	74,39	74,39	70,42	50	68	70	73	67	71
5	15,69	72,06	73,68	71,70	70,00	74,18	48	67	69	72	68	70
χ	15,24	72,49	73,14	73,55	72,78	72,33	48,20	68,80	70,20	71,60	68,60	70,20
SD	1,51	1,77	1,05	1,69	1,71	1,84	1,79	1,30	1,30	1,14	1,34	0,84

n	Abnormalitas (%)						Fertilitas (%)					
	Susu skim						Susu skim					
	0%	18%	19%	20%	21%	22%	0%	18%	19%	20%	21%	22%
1	37	26	23	23	23	22	31,82	61,54	60,76	68,75	68,46	63,16
2	38	25	24	22	22	25	31,25	64,29	61,11	67,78	63,78	63,16
3	35	24	25	21	24	26	33,33	66,25	64,16	66,67	69,65	66,67
4	36	26	23	22	23	24	32,06	62,50	64,29	70,00	63,08	64,29
5	39	27	24	22	23	28	32,86	63,16	65,92	66,67	64,29	67,23
χ	37,00	25,60	23,80	22,00	23,00	24,80	32,26	63,55	63,25	67,97	65,57	64,70
SD	1,58	1,14	0,84	0,71	0,71	1,92	0,83	1,81	2,23	1,43	2,10	1,67

Keterangan: n = ulangan χ = nilai rerata SD = standar deviasi

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Penggunaan campuran 5% metanol dan susu skim konsentrasi 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% memberikan perlindungan yang sama baik terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dibandingkan kontrol (susu skim 0%).
2. Campuran 5% metanol dan susu skim 18% lebih efisien digunakan untuk mempertahankan motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi dibandingkan konsentrasi susu skim lainnya (19%, 20%, 21%, dan 22%), dengan nilai rerata persentase masing-masing sebesar $72,49 \pm 1,77\%$; $68,80 \pm 1,30\%$; $25,60 \pm 1,14\%$; dan $63,55 \pm 1,81\%$.

5.2. Saran

1. Diperlukan penelitian fertilisasi spermatozoa ikan tawes pascakriopreservasi selama penyimpanan lebih dari satu hari.
2. Diperlukan penelitian fertilisasi spermatozoa menggunakan campuran krioprotektan berupa metanol dan susu skim pada spesies ikan yang berbeda.

DAFTAR REFERENSI

- Afandi, R. & U.M. Tang. 2000. Biologi Reproduksi Ikan. Laporan. Pekanbaru: Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan Perairan. *Dalam: Yustina, Arnentis, & Darmawati. 2003. Daya tetas dan laju pertumbuhan larva ikan hias *Betta splendens* di habitat buatan. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2): 129--132.*
- Ahammad, M.M., D. Bhattacharyya & B.B. Jana. 2002. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology* 44: 114--121.
- Akçay, E., Y. Bozkurt, S. Secer & N. Tekun. 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkey Journal Veterinary Animal Science* 28: 837--843.
- Akhter, T., M.S. Islam, M.A. Hossain, M.S. Islam, L. Hussain & M.G. Hussain. 2003. Evaluation of reproductive traits of four strains of silver barb (*Barbodes gonionotus*, Bleeker). *Asian Fisheries Science* 16: 17--24.
- 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.
- Alavi, S.M.H., J. Cosson, K. Coward & G. Rafiee. 2007. Fish spermatology. 2007: 49 hlm.
<http://www.fisionut.fcien.edu.uy/FISIOLOGIA%202010/pdfs2010/p.pdf>,
12 Oktober 2010, pk. 14.32.
- Alvarenga, M.A, F.O. Papa, F.C. Landim-Alvarenga, A.S.L. Medeiros. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen. *A. Review. Animal Reproduction Science* 89:105-113. *Dalam: Arifiantini, R.I., B. Purwantara, T.L. Yusuf & D. Sajuthi. 2010. Effect of different cryoprotective agents on skim milk and dimitropoulos extender for stallion semen cryopreservation. *Journal of Indonesian Tropical and Animal Agriculture* 35(1): 68--74.*
- Anindita, I. 2010. Pengaruh pemberian berbagai konsentrasi susu skim terhadap kualitas spermatozoa ikan gurami (*Osphronemus gouramy*, Lacepede

- 1801) dua hari pascakriopreservasi. Skripsi S1 - Biologi FMIPA UI, Depok: xv + 80 hlm.
- Arifiantini, R.I. & T.L. Yusuf. 2004. Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi Friesien holstein. Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor: 11 hlm.
- 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.
- Arifiantini, R.I., B. Purwantara, T.L. Yusuf & D. Sajuthi. 2010. Effect of different cryoprotective agents on skim milk and dimitropoulos extender for stallion semen cryopreservation. *Journal of Indonesian Tropical and Animal Agriculture* **35**(1): 68--74.
- Azizah & R.I. Arifiantini. 2009. Kualitas semen beku kuda pada pengencer susu skim dengan konsentrasi gliserol yang berbeda. *Jurnal Veteriner* **10**(2): 63--70.
- Billiard, R., J. Cosson, G. Perchee & O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* **129**: 95--112.
- Billiet, P. & S. Burchill. 2010. Animal Reproduction. 2010: 1 hlm. <http://www.saburchill.com/chapters/chap0031.html>, 3 Juli 2010, pk. 10.10.
- Bozkurt, Y. & S. Secer. 2005. Effect of short-term preservation of mirror carp (*Cyprinus carpio*) semen on motility, fertilization, and hatching rates. *The Israeli Journal of Aquaculture* **57**(3): 207--212.
- Bozkurt, Y. 2006. The relationship between body condition, sperm quality parameters and fertilization success in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances* **5**(4): 284--288.
- Bozkurt, Y., F. Ogretmen, F.S. Secer & U. Ercin. 2009. Relationship between seminal plasma composition and spermatological parameters in scaly carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal and Veterinary Advances* **8**(12): 2745--2749.

- Brandis, K. 2010. Acid-Base Physiology: Metabolic Acidosis due to Drugs and Toxins. 2010: 1 hlm.
http://www.anaesthesiamcq.com/AcidBaseBook/ab8_6a.php, 13 November 2010, pk. 18.06.
- Bryman, A. & D. Cramer. 2005. *Quantitative data analysis with SPSS 12 and 13*. Routledge, London: xv + 367 hlm.
- CAB International. 2006. *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850). 2006: 1 hlm.
<http://www.cabicompendium.org/NamesLists/AC/Full/PUNTGO.htm>, 3 Juli 2010, pk. 10.10.
- Cabrita, E., V. Robles, S. Cunado, J.C. Wallace, C. Sarasquete & M.P. Herraiez. 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* **50**: 273--284.
- CEC (Cetiner Engineering Corporation). 2010. Properties of methanol. (?): 1.
<http://www.cetinerengineering.com/Properties.htm>, 28 Oktober 2010, pk. 10.30.
- Chheng, P., Baran, E., Touch, B.T. 2004. Synthesis of all published information on Java barb *Barbonymus gonionotus* ("trey chhpin") based on FshBase 2004. *WorldFish Center and Inland Fisheries Research and Development Institute, Phnom Penh, Cambodia*. 20 hlm.
- Čipak, A., P. Stanić, K. Đurić, T. Serdar & E. Suchanek. 2009. Sperm morphology assessment according to WHO and strict criteria: method comparison and intra-laboratory variability. *Biochimica Medica* **19**(1): 87--94.
- Draper, B.W. & C.B. Moens. 2009. A high-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization. *Journal of Visualized Experiments* **29**: 1--3.
- Fujaya, Y. 2002. *Fisiologi ikan: Dasar pengembangan teknologi perikanan*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta: vii + 204 hlm.
- Gazali, M. & S.T. Tambing. 2001. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati* **9**(1): 27--32.

- Goff, D. 1995. Dairy chemistry and physics. (?): 17 hlm.
<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>, 28 Oktober 2010,
pk. 13.10.
- Hanafiah, K.A. 2004. *Rancangan percobaan: Teori dan aplikasi*. PT. Raja
Grafindo Persada, Jakarta: xiv + 186 hlm.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa.
Aquaculture **32**: 313--320.
- He, S. & L.C. Woods III. 2004. Changes in motility, ultrastructure, and
fertilization capacity of striped bass *Morone saxatilis* spermatozoa
following cryopreservation. *Aquaculture* **236**: 677--686.
- He, S., K. Jenkins-Keeran & L.C. Woods III. 2004. Activation of sperm motility
in striped bass via a cAMP-independent pathway. *Theriogenology* **61**:
1487--1498.
- Hidayaturrahmah. 2007. Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas
(*Cyprinus carpio* L.) pada beberapa konsentrasi larutan fruktosa.
Bioscientiae **4**(1): 9--18.
- Hiemstra, S.J., T. van der Lende & H. Woelders. 2005. The potential of
cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic
resources conservation strategies. *The Role of Biotechnology, Italy* 5--7
March 2005: 25--36.
- Horváth, A., E. Miskolczi & B. Urbanyi. 2003. Cryopreservation of common carp
sperm. *Aquatic Living Resources* **16**: 457--460.
- Horváth, A., E. Miskolczi, S. Mihálffy, K. Ösz, K. Szabó, & B. Urbányi. 2007.
Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5
ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with
cryopreserved sperm. *Cryobiology* **54**: 251--257.
- HPA (Health Protection Agency). 2010. Cell Counting Using a Haemocytometer.
2010: 1 hlm. <http://www.hpacultures.org.uk/technical/ccp/cellcounting.jsp>,
13 November 2010, pk. 15.15.
- Jamieson, B.G.M. 1991. *Fish evolution and systematic: Evidence from
spermatozoa*. 1st ed. Cambridge University Press, New York: xv + 319
hlm.

- Jensen, N.R., M.D. Zuccarelli, S.J. Patton, S.R. Williams, S.C. Ireland & K.D. Cain. 2008. Cryopreservation and methanol effects on burbot sperm motility and egg fertilization. *North American Journal of Aquaculture* **70**: 38--42.
- Kopeika, E., J. Kopeika & T. Zhang. 2005. Cryopreservation of fish sperm. *Dalam: Day, J.G. & G.N. Stacey (eds.). 2007. Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2nd ed. Humana Press Inc., Totowa: xi + 347 hlm.
- Lahnsteiner, F., N. Mansour & T. Weismann. 2002. The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). *Cryobiology* **45**: 195--203.
- Lessard, C., S. Parent, P. Leclerc, J.L. Bailey, & R. Sullivan. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology* **21**(5): 700--707.
- Leung, L.K.P. 1991. Principles of biological cryopreservation. *Dalam: Jamieson, B.G.M. 1991. Fish evolution and systematic: Evidence from spermatozoa*. 1st ed. Cambridge University Press, New York: xv + 319 hlm.
- Leung, L.K.P. & B.G.M. Jamieson. 1991. Live preservation of fish gametes. *Dalam: Jamieson, B.G.M. (ed.). 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge: 245--269.
- 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.
- 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.
- Müller, K., P. Müller, G. Pincemy, A. Kurz, & C. Labbe. 2008. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification:

- Consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology of Reproduction* **78**: 390--399.
- 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.
- NIBB (National Institute for Basic Biology). 2004. Annual Report 2003-Department of Cell Biology. 2004: 1 hlm.
http://www.nibb.ac.jp/annual_report/2003/03ann201.html, 13 November 2010, pk. 19.22.
- Nugroho, E. & A.H. Kristanto. 2008. *Panduan lengkap ikan konsumsi air tawar populer*. Penebar Swadaya, Jakarta: iv + 164 hlm.
- Perchec, G., C. Jeulin, J. Cosson, F. Andre & R. Billard. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* **108**: 747--753.
- Rahayu, S. 2009. Pengaruh kuning telur sebagai ko-krioprotektan terhadap kualitas spermatozoa ikan tawes, *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850) satu hari pascakriopreservasi. Skripsi S1 - Biologi FMIPA UI, Depok: ix + 95 hlm.
- Rahman, F., M.R.I. Sarder & M.A. Rouf. 2009. Comparison of growth performance between cryopreserved and fresh sperm-originated fry of *Barbonymus goionotus*. *Journal of the Bangladesh Agricultural University* **7**(1): 145--149.
- Rajeev, L. 2010. Skim Milk: Calories in Skim Milk. 2010: 2 hlm.
<http://www.buzzle.com/articles/skim-milk-calories-in-skim-milk.html>, 16 Juli 2010, pk. 22.45.
- Rurangwa, E. I. Roelants, G. Huyskens, M. Ebrahimi, D.E. Kime & F. Ollevier. 1998. The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Dalam*: Sunarma, A. 2007. Kriopreservasi spermatozoa ikan nilam (*Osteochilus hasseltii*) menggunakan ekstender dan krioprotektan berbeda. Tesis Program Pascasarjana - Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto: xvii + 73 hlm.

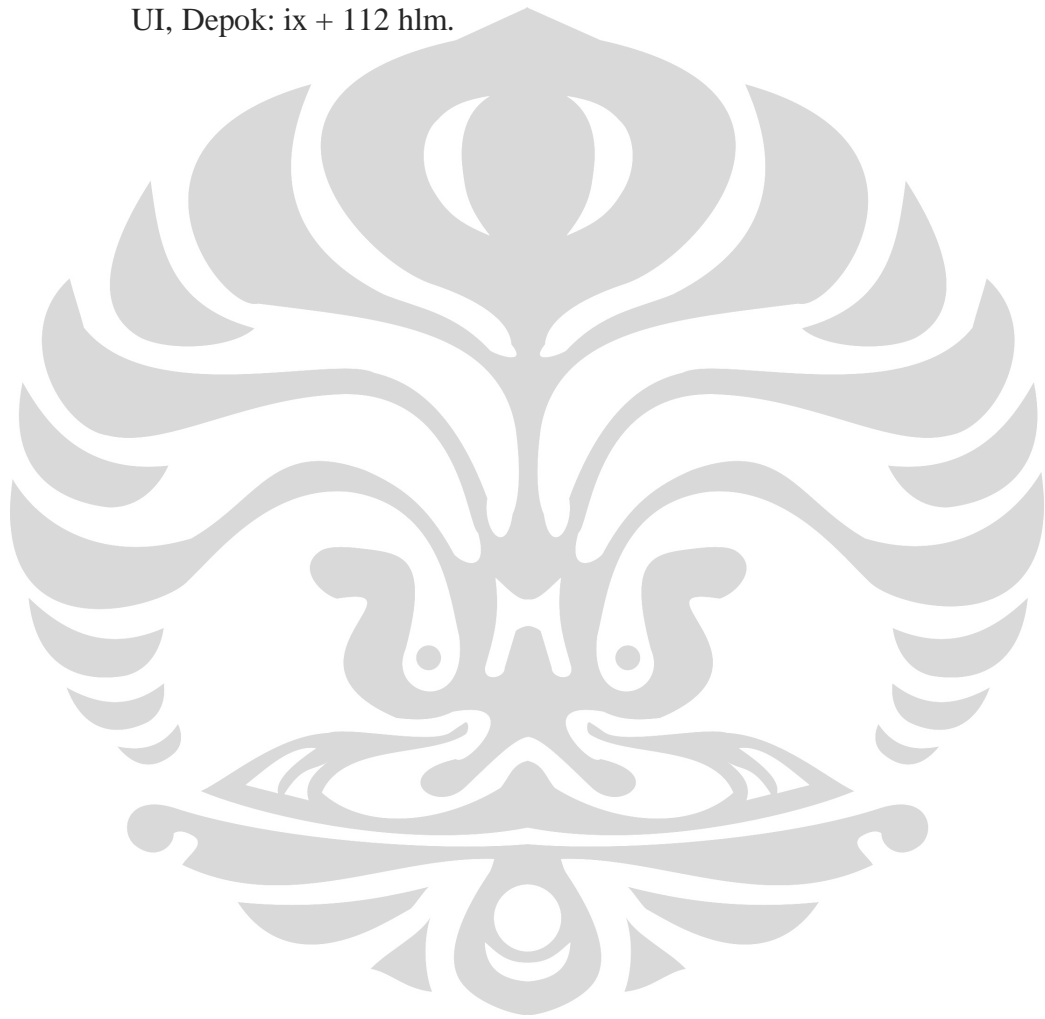
- Rurangwa, E., D.E. Kime, F. Ollevier & J.P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**: 1--28.
- Routray, P., D.K. Verma, S.K. Sarkar & N. Sarangi. 2007. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. *Fish Physiology Biochemistry* **10**: 1--15.
- Salaspuro, V. 2007. Pharmacological treatments and strategies for reducing oral and intestinal acetaldehyde. *Dalam*: Chadwick, D. & J. Goode (eds.). 2007. *Acetaldehyde-related pathology: Bridging the trans-disciplinary divide*. Novartis Foundation Symposium, 2007. John Wiley & Sons, Chichester: 145--157.
- 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.
- Simione, F.P. 2003. *Cryopreservation manual*. Nalge Nunc International Corp., Los Angeles: 13 hlm.
- Singsee, S., U. Imsilp, P. Pewnane & N. Sukumasavin. 2005. Preservation of *Cirrhinus microlepis* sperm. *Proceedings of 7th Technical Symposium on Mekong Fisheries Ubon Ratchathani, Thailand, 15th-17th November 2005*: 205--211.
- Sukumasavin, N. 2008. *Advanced freshwater aquaculture : Fish reproduction*. Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Thailand: 133--159 hlm.
- Sultana, M., M. Nahiduzzaman, M.M. Hasan, M.U.H. Khanam & M.A.R. Hossain. 2010. Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Journals of Zoology Rajshahi University* **28**: 51--55.
- Sunarma, A. 2007. Kriopreservasi spermatozoa ikan nilam (*Osteochilus hasseltii*) menggunakan ekstender dan krioprotektan berbeda. Tesis Program Pascasarjana - Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto: xvii + 73 hlm.
- Tambing, S.N. 2005. Penyimpanan pembawa materi genetik ternak dengan teknik kriopreservasi. 2010: 2 hlm.

- http://sulsel.litbang.deptan.go.id/index.php?option=com_content&view=article&id=175:penyimpanan-pembawa-materi-genetik-ternak-dengan-teknik-kriopreservasi-&catid=44:buletin-volume-i-nomor-i-tahun-2005&Itemid=53, 23 Juli 2010, pk. 13.50.
- Terra (Terra Nitrogen Corporation). 2001. Methanol. April 2001: 8 hlm.
<http://www.methanol.org/pdf/MethanolMSDS.pdf>, 16 Juli 2010, pk. 21.37.
- The Dairy Council. 2010. Varieties of milk. 2010: 2 hlm.
<http://www.milk.co.uk/page.aspx?intPageID=43>, 23 Juli 2010, pk. 13.01.
- Thru. 2007. Methanol Structure. 2010: 1 hlm.
<http://newenergyandfuel.com/http://newenergyandfuel.com/2008/05/08/is-methanol-the-up-and-coming-alcohol-for-fuel/methanol-structure/>, 13 November 2010, pk. 17.18.
- Timbrell, J.A. 2008. *Principles of biochemical toxicology*. 4th ed. Informa Health Care Inc., New York: 453 hlm.
- Torres. 2010. *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850). April 2010: 1 hlm.
<http://www.fishbase.org/physiology/MorphDataSummary.php?genusname=Barbonymus&speciesname=gonionotus&autoctr=290>, 1 Juli 2010, pk. 13.01.
- Varnam, A.H. & J.P. Sutherland. 2001. *Milk and milk products: Technology, chemistry, and microbiology*. Chapman & Hall, New York: 451 hlm.
- Verma, D.K., P. Routray, C. Dash, S. Dasgupta, & J.K. Jena. 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **9**: 67--76.
- Viveiros, A.T.M., N. So & J. Komen. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: Cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. *Theriogenology* **54**: 1.395--1.408.
- 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.

Yustina, Arnentis, & Darmawati. 2003. Daya tetas dan laju pertumbuhan larva ikan hias *Betta splendens* di habitat buatan. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2): 129--132.

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

Zuraida. 2009. Pengaruh kombinasi 5% metanol dengan berbagai konsentrasi sususkim terhadap kualitas spermatozoa ikan tawes, *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850) satu hari pascakriopresrvasi. Skripsi S1 - Biologi FMIPA UI, Depok: ix + 112 hlm.



Lampiran 1

Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

Tujuan : untuk mengetahui normalitas data

Hipotesis :

$H_0(1)$: data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

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

$H_0(2)$: data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

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

$H_0(3)$: data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

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

$H_0(4)$: data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

$H_a(4)$: data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal

Keterangan:

Nilai yang digunakan adalah $db = n = 30$, $P =$ 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 tawes satu hari pascakriopreservasi

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
motilitas	0,518	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

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

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
viabilitas	0,626	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

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

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
abnormalitas	0,731	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

- D. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

(lanjutan)

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
fertilitas	0,623	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

Kesimpulan:

1. Data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal
2. Data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal
3. Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal
4. Data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal

Lampiran 2

Uji homogenitas Levene terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data

Hipotesis :

$H_0(1)$: data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

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

$H_0(2)$: data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

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

$H_0(3)$: data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

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

$H_0(4)$: data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

$H_a(4)$: data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu 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 tawes satu hari pascakriopreservasi

Levene Statistic	df1	df2	P
0,558	5	24	0,731

$P = 0,731 \rightarrow P > 0,05$, maka H_0 diterima

- B. Uji homogenitas Levene terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

Levene Statistic	df1	df2	P
1,204	5	24	0,426

$P = 0,426 \rightarrow P > 0,05$, maka H_0 diterima

- C. Uji homogenitas Levene terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

Levene Statistic	df1	df2	P
1,880	5	24	0,135

$P = 0,135 \rightarrow P > 0,05$, maka H_0 diterima

- D. Uji homogenitas Levene terhadap data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

Levene Statistic	df1	df2	P
2,380	5	24	0,069

$P = 0,069 \rightarrow P > 0,05$, maka H_0 diterima

Kesimpulan:

1. Data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen
2. Data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen
3. Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen
4. Data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi bervariasi homogen

Keterangan:

Data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas tidak berdistribusi normal, tetapi bervariasi homogen. Oleh karena itu, data tersebut ditransformasi, kemudian diuji kembali.

Lampiran 3

Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi (data hasil transformasi)

Tujuan : untuk mengetahui normalitas data

Hipotesis :

$H_0(1)$: data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

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

$H_0(2)$: data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

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

$H_0(3)$: data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

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

$H_0(4)$: data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi berdistribusi normal

$H_a(4)$: data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal

Keterangan:

Nilai yang digunakan adalah $db = n = 30$, $P = \text{probabilitas}$

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 hasil transformasi persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
motilitas	0,521	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

B. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data hasil transformasi persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
motilitas	0,521	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

C. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data hasil transformasi persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
viabilitas	0,636	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

D. Uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data hasil transformasi persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
fertilitas	0,626	30	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

Kesimpulan:

1. Data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal
2. Data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal
3. Data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal
4. Data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi tidak berdistribusi normal

Keterangan:

Data tidak memenuhi syarat normalitas dan homogenitas. Oleh karena itu, pengujian dilanjutkan dengan uji non-parametrik, yaitu uji Kruskal-Wallis.

Lampiran 4

Uji Kruskal-Wallis terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

Tujuan : untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nilai rata-rata persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%)

Hipotesis :

$H_0(1)$: nilai rata-rata data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) tidak berbeda nyata

$H_a(1)$: nilai rata-rata data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata

$H_0(2)$: nilai rata-rata data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) tidak berbeda nyata

$H_a(2)$: nilai rata-rata data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata

$H_0(3)$: nilai rata-rata data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) tidak berbeda nyata

$H_a(3)$: nilai rata-rata data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata

$H_0(4)$: nilai rata-rata data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) tidak berbeda nyata

$H_a(4)$: nilai rata-rata data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) 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 non-parametrik (Kruskal-Wallis) terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	motilitas
<i>Chi-Square</i>	12,957
df	5
P	0,024

$P = 0,024 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

B. Uji non-parametrik (Kruskal-Wallis) terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	motilitas
<i>Chi-Square</i>	20,531
df	5
P	0,001

$P = 0,001 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

C. Uji non-parametrik (Kruskal-Wallis) terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	motilitas
<i>Chi-Square</i>	22,604
df	5
P	0,000

$P = 0,000 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

D. Uji non-parametrik (Kruskal-Wallis) terhadap data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	motilitas
<i>Chi-Square</i>	19,759
df	5
P	0,001

$P = 0,001 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

Kesimpulan:

1. Nilai rata-rata data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata
2. Nilai rata-rata data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata
3. Nilai rata-rata data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata

4. Nilai rata-rata data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi pada berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) berbeda nyata



Lampiran 5

Uji perbandingan berganda Dunnet terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

- Tujuan : untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antarkelompok perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
- Hipotesis :
- H₀(1) : tidak terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
 - H_a(1) : terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
 - H₀(2) : tidak terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
 - H_a(2) : terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
 - H₀(3) : tidak terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

$H_a(3)$: terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

$H_0(4)$: tidak terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

$H_a(4)$: terdapat perbedaan antar perlakuan berbagai konsentrasi susu skim (0%, 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%) terhadap data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu 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 Dunnet terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	P						α
SS 0%							0,05
SS 18%	0,000*						
SS 19%	0,000*	1,000					
SS 20%	0,000*	0,999	1,000				
SS 21%	0,000*	1,000	1,000	0,999			
SS 22%	0,000*	1,000	1,000	0,986	1,000		
	SS 0%	SS 18%	SS 19%	SS 20%	SS 21%	SS 22%	

B. Uji perbandingan berganda Dunnet terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	P						α
SS 0%							0,05
SS 18%	0,000*						
SS 19%	0,000*	0,734					
SS 20%	0,000*	0,072	0,671				
SS 21%	0,000*	1,000	0,611	0,057			
SS 22%	0,000*	0,552	1,000	0,450	0,432		
	SS 0%	SS 18%	SS 19%	SS 20%	SS 21%	SS 22%	

C. Uji perbandingan berganda Dunnet terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	P						α
SS 0%							0,05
SS 18%	0,000*						
SS 19%	0,000*	0,212					
SS 20%	0,000*	0,006*	0,068				
SS 21%	0,000*	0,037*	0,769	0,443			
SS 22%	0,000*	0,997	0,974	0,206	0,600		
	SS 0%	SS 18%	SS 19%	SS 20%	SS 21%	SS 22%	

D. Uji perbandingan berganda Dunnet terhadap data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi

	P						α
SS 0%							0,05
SS 18%	0,000*						
SS 19%	0,000*	1,000					
SS 20%	0,000*	0,068	0,063				
SS 21%	0,000*	0,818	0,703	0,681			
SS 22%	0,000*	0,973	0,900	0,176	1,000		
	SS 0%	SS 18%	SS 19%	SS 20%	SS 21%	SS 22%	

Keterangan:

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

Kesimpulan:

1. Terdapat perbedaan antarkelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% terhadap data persentase motilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
2. Terdapat perbedaan antarkelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% terhadap data persentase viabilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
3. Terdapat perbedaan antarkelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22%, serta antarkelompok perlakuan susu skim konsentrasi 18% dengan 20% dan 21% terhadap data persentase abnormalitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi
4. Terdapat perbedaan antarkelompok perlakuan susu skim konsentrasi 0% dengan 18%, 19%, 20%, 21%, dan 22% terhadap data persentase fertilitas spermatozoa ikan tawes satu hari pascakriopreservasi