

Pengaruh Konsentrasi Larutan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Ikan Patin (*pangasius pangasius*) selama Masa Penyimpanan

Arsetyo Rahardhianto, Nurlita Abdulgani, dan Ninis Trisyani
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111
E-mail: nurlita@bio.its.ac.id

Abstrak—Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh konsentrasi larutan madu dalam NaCl fisiologis terhadap kualitas sperma dalam penyimpanan yang meliputi motilitas spermatozoa dan viabilitas spermatozoa ikan patin dan berapakah dosis konsentrasi larutan madu dalam NaCl fisiologis terhadap proses penyimpanan sperma ikan patin (*Pangasius pangasius*). Penelitian ini disusun rancangan percobaan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perbedaan perlakuan dari pengencer madu dalam NaCl fisiologis antara lain DO (0%), D1 (0,2 %), D2 (0,4 %), D3 (0,6 %), D4 (0,8 %). Simpan perlakuan tersebut pada lemari es dengan suhu 4°C dan selanjutnya diamati setiap 6 jam sekali selama 48 jam. Data dianalisa dengan Anova dan dilanjutkan dengan Uji Jarang Berganda Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan larutan NaCl fisiologis dan madu sebagai bahan pengencer dalam penyimpanan sperma ikan patin (*Pangasius pangasius*) berpengaruh terhadap pergerakan (motilitas) dan ketahanan hidup (viabilitas) spermatozoa ikan patin. Pada penelitian interaksi yang menghasilkan persentase motilitas tertinggi yaitu D3 dan D2 pada pengamatan T1 (6 jam). Dan persentase viabilitas spermatozoa ikan patin paling baik terdapat pada larutan pengencer D3 dan D4 pada pengamatan T1 (6 jam).

Kata Kunci— NaCl Fisiologis, Madu, Motilitas, *Pangasius pangasius*, Spermatozoa, Viabilitas

I. PENDAHULUAN

IKAN patin (*Pangasius pangasius*) merupakan ikan konsumsi yang terus berkembang. Berdasarkan data Ditjen Perikanan Budi Daya Tangkap, Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) kebutuhan benih ikan patin secara nasional mencapai 55 juta ekor per bulannya [1]. Hal tersebut dikarenakan ikan patin termasuk jenis ikan air tawar yang memiliki nilai ekonomis penting. Harga jualnya cukup menjanjikan, umumnya di atas harga jual rata-rata ikan konsumsi jenis lain karena rasa dagingnya yang lezat. Nilai protein daging ikan patin juga tergolong tinggi, mencapai 68,6%. Kandungan gizi lainnya adalah lemak 5,8%, abu ,5%, dan air 59,3% [2].

Usaha dan peningkatan produksi benih ikan patin perlu dijaga terus-menerus dikarenakan hambatan yang terjadi saat pemijahan ikan patin secara alami yang terjadi setahun sekali, telur dan semen tidak tersedia sepanjang tahun karena termasuk ikan petelur musiman, gonad jantan dan betina ikan

patin tidak matang pada waktu yang sama di kolam budidaya selain itu [3]. Motilitas dan viabilitas spermatozoa akan terus menurun setelah dikeluarkan dari tubuh ikan. Salah satu cara yang bisa menyediakan ikan patin sepanjang tahun yaitu melalui penyimpanan spermatozoa induk jantan [4].

Rujukan [5]. menyatakan penyimpanan sperma bertujuan dalam mengoptimalkan jangka waktu penggunaan spermatozoa induk jantan yang unggul untuk membuahi sel telur betina yang sejenis secara buatan. Selain itu untuk memudahkan persilangan antara jenis-jenis ikan yang waktu matang gonad yang berbeda serta untuk memudahkan transportasi penyebaran semen ke daerah yang membutuhkan. Proses penyimpanan ini memerlukan bahan pengencer yang dapat mengurangi aktifitas spermatozoa sehingga menghambat pemakaian energi dan dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa [6]. Bahan yang sering digunakan untuk pengenceran semen yaitu larutan NaCl. Larutan NaCl memberi sifat buffer, mempertahankan pH semen dalam suhu kamar, bersifat isotonis dengan cairan sel, melindungi spermatozoa terhadap coldshock dan penyeimbangan elektron yang sesuai [7]. Tetapi penyimpanan semen dengan larutan pengencer NaCl fisiologis hanya bisa digunakan tidak lebih dari 60 menit setelah penampungan karena kurang mengandung sumber energi yang dibutuhkan oleh spermatozoa. Untuk itu perlu tambahan bahan lain yang bersifat memberikan energi atau nutritif sehingga dapat memperpanjang waktu spermatozoa untuk bertahan hidup dan mempertahankan pergerakan spermatozoa dalam media penyimpanan [8].

Energi yang dibutuhkan oleh spermatozoa ini disediakan oleh gula sederhana (monosakarida) seperti fruktosa dan glukosa. Penambahan fruktosa atau glukosa dalam pengencer berguna untuk mendukung daya hidup spermatozoa pasca pengenceran. Karena proses pembentukan Adenosin Trifosfat (ATP) dan Adenosin Difosfat (ADP) harus terus dilakukan agar motilitas dapat terus berlangsung [9]. Gula sederhana (monosakarida) yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menjaga kelangsungan hidupnya terkandung dalam madu. Berdasarkan data *United States Department of Agriculture* (USDA), madu mengandung 38% fruktosa; 31% glukosa; 17,1 % air; 7,2% maltose; 4,2% trisakarida dan beberapa polisakarida, 1,5% sukrosa, 0,5% mineral, vitamin dan enzim

[10]. Disisi lain plasma semen memiliki kandungan bahan glukosa, protein plasma, urea, garam-garam mineral, ion-ion dan lipid yang berfungsi sebagai médium pada spermatozoa [5]. Madu sebagai penambahan bahan energi/nutrisi dari pengencer NaCl fisiologis diharapkan dapat mendukung daya hidup dan pergerakan spermatozoa dalam proses penyimpanan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh larutan pengencer yang terdiri dari madu dalam NaCl fisiologis terhadap kualitas sperma dalam penyimpanan yang meliputi motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan patin dan untuk menentukan larutan pengencer terbaik terhadap proses penyimpanan sperma ikan patin (*Pangasius pangasius*).

II. TINJAUAN PUSTAKA

Ikan patin memiliki spesiesnya cukup banyak, ikan yang bernama ilmiah *Pangasius* di Indonesia terdiri dari *Pangasius pangasius* atau *P. djambal*, *P. humeralis*, *P. lithostoma*, *P. macronema*, *P. micronemus*, *P. nasutus*, *P. nienwenhuisii* dan *P. olyuranodon*. Jenis-jenis tersebut merupakan ikan atau spesies asli (indigenous species) yang berada di perairan umum Indonesia. Jenis *P. sutchi* dan *P. hypophthalmus* yang dikenal sebagai jambal siam, patin siam, atau lele Bangkok merupakan ikan introduksi dari Thailand. Ikan patin merupakan nama Indonesia dari *Pangasius pangasius* [11].

Di habitat aslinya, patin memijah pada musim penghujan sehinggabehinya banyak ditemukan pada bulan Maret-Mei. Patin matang kelamin pada usai 2-3 tahun dengan berat diatas 1,5 kg. Induk patin yang berbobot 5-6 kg dapat menghasilkan telur 1,5 juta butir pada ikan betina dan menghasilkan semen 2 ml – 16 ml, dengan konsentrasi spermatozoanya $9,4 \times 10^9$ sel sperma/ml, motilitasnya 70%-99% dengan pH 7,14-7,85. Patin siam (*P. hypophthalmus*) memiliki fekunditas atau jumlah telur yang lebih banyak daripada patin jambal (*P. djambal*) [12].

Spermatozoa ikan biasanya imotile dan tidak aktif ketika berada di dalam testis. Motilitas dari sperma dimulai setelah spermiasi di dalam lingkungan air di dalam sistem reproduksi betina dengan demikian aktivitas dari sperma mungkin terjadi ketika faktor tekanan dicairkan, pH menjadi alkalin dan osmolalitas menjadi hipotonik, secara berturut-turut. Rata-rata panjang total spermatozoa ikan teleostei adalah 40-60 μ dengan panjang kepala hanya 2-3 μ . [5]. Walaupun ukuran dan bentuk spermatozoa berbeda pada jenis ikan hewan, namun struktur morfologinya adalah sama. Permukaan sperma di bungkus oleh suatu membran liporotein. Apabila sela tersebut mati, permaetabilitas membranya meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan semen yang membedakan sperma yang hidup dan yang mati [13].

Terdapat 5 syarat pengencer spermatozoa yang ideal, yakni: isotonic, memiliki kemampuan menyangga dengan baik, mengandung nutrisi yang menstabilkan koloid-koloid dan antioksidan, anti bakteri dan mampu melindungi sperma dari kejutan dingin. Bahan pengencer berhubungan erat dengan komposisi ionic plasmaseminal atau plasma darah [5].

III. METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2012. Ikan diperoleh dari hasil kolam Unit Pengelola Budidaya Air Tawar

(UPBAT) Dinas Kelautan dan Perikanan Propinsi Jawa Timur, Kec. Dlanggu, Mojokerto. Sedangkan untuk proses penyimpanan dan analisa spermatozoa di lakukan pada Laboratorium Zoology – Biologi FMIPA ITS.

A. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop, gelas objek, gelas penutup, tabung *Eppendorf*, *thermometer*, *autoclave*, *Erlenmeyer*, *syringe* tanpa jarum, *handtally counter*, timbangan analitik, gelas ukur, kain serbet halus, kertas pH, pipet, *haemocytometer*, aluminium foil, tissue, toples plastik dan lemari pendingin. Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu NaCl Fisiologis, madu, larutan eosin, aquadest, Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) jantan yang telah matang gonad untuk diambil spermanya.

B. Cara Kerja

Larutan pengencer dibuat dengan cara menggunakan madu yang dilarutkan dalam NaCl Fisiologis. Campuran madu dan NaCl fisiologis yang selanjutnya akan disebut sebagai Larutan Pengencer. Variasi larutan pengencer yaitu dari 0,2%, 0,4%, 0,6% dan 0,8%. Konsentrasi larutan pengencer dalam satuan % setara dengan ml/100ml.

- (D0) kontrol (sperma + 0 ml madu dalam 100 ml NaCl Fisiologis)
- (D1) 0,2 % larutan (sperma + 0,2 ml madu dalam 99,8 ml NaCl Fisiologis)
- (D2) 0,4 % larutan (sperma + 0,4 ml madu dalam 99,6 ml NaCl Fisiologis)
- (D3) 0,6 % larutan (sperma + 0,6 ml madu dalam 99,4 ml NaCl Fisiologis)
- (D4) 0,8 % larutan (sperma + 0,8 ml madu dalam 99,2 ml NaCl Fisiologis)

Spermatozoa diperoleh dengan mengurut bagian perut ikan ke arah anal [9]. Spermatozoa yang telah didapatkan lalu ditampung dan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis berupa pengamatan terhadap volume, warna, bau dan pH spermatozoa. Pengamatan mikroskopis berupa penentuan konsentrasi spermatozoa ikan, penentuan persentase hidup (viabilitas) spermatozoa dan pergerakan (motilitas) spermatozoa.

Cairan sperma yang telah dikeluarkan dari tubuh ikan diambil 0,1 ml kemudian di campurkan dengan beberapa konsentrasi larutan pengencer yang telah sebelumnya dibuat pada tabung eppendorf. Pengenceran sperma dilakukan dengan menggunakan perbandingan sperma : pengencer = 1:9 [6].

Pengamatan sperma dilakukan selama 2 hari dengan interval waktu pengamatan 6 jam sekali.

- (T1) pengamatan 6 jam
- (T2) pengamatan 12 jam
- (T3) pengamatan 18 jam
- (T4) pengamatan 24 jam
- (T5) pengamatan 30 jam
- (T6) pengamatan 36 jam
- (T7) pengamatan 42 jam
- (T8) pengamatan 48 jam

Pengamatan motilitas dilakukan dengan cara mengambil satu tetes sperma dengan menggunakan pipet ($\pm 0,01$ ml) dan

diletakkan pada *obyek glass* kemudian diteteskan dengan aquades diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400X [14]. Hitung spermatozoa yang masih bergerak. Pengamatan viabilitas dilakukan dengan cara menggunakan pengencer berupa larutan pewarna *eosin*. Prosedur pengamatan dengan metode pewarnaan yaitu dengan mengambil satu tetes sperma ($\pm 0,01$ ml) yang telah disimpan tadi dan letakkan pada *obyek glass* kemudian ditambah dengan cairan pewarna *eosin* lalu homogenkan, selanjutnya dibuat preparat dengan cara menekan dan mendorong menggunakan *cover glass* membentuk sudut 45° kemudian dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x, untuk dihitung jumlah spermatozoa yang hidup dan berapa jumlah spermatozoa yang mati agar dapat diperoleh viabilitas dari spermatozoa. Sperma yang mati akan menyerap zat warna merah dan yang hidup akan tetap berwarna transparan pada bagian dalam selnya [14].

C. Analisa Data

Penelitian ini memiliki 5 perlakuan dan masing 3 ulangan. Karena seluruh satuan percobaan dianggap homogen maka rancangan yang digunakan yaitu RAL (Rancangan Acak Lengkap) menggunakan Analisis Ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan [15].

IV. ANALISA DATA DAN PEMBAHASAN

A. Kualitas Sperma Segar Ikan Patin (*Pangasius pangasius*)

Pemeriksaan awal kualitas sperma sangat penting untuk menentukan apakah sperma yang digunakan layak atau tidak untuk digunakan sebagai stok sperma yang akan disimpan. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis terhadap sperma segar dari ikan patin (*Pangasius pangasius*) yang telah diambil di UPBAT dengan cara *stripping* yang digunakan untuk penelitian ditunjukkan dalam Tabel 1.

Tabel 1.

Tabel Pengamatan Spermatozoa Segar Ikan Patin (*Pangasius pangasius*)

| Kriteria Pengamatan | Hasil |
|-------------------------|---------------------------|
| Volume sperma | 7,8 ml |
| Warna sperma | Putih susu |
| pH sperma | 7,6 |
| Konsentrasi spermatozoa | $11,2 \times 10^9$ sel/ml |
| Berat Ikan | 2,6 kg |
| Umur Ikan | 4 tahun |
| Motilitas | 97 % |
| Viabilitas | 98 % |

Berdasarkan hasil dari pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis sperma segar ikan patin tersebut yaitu masih layak dijadikan sampel penyimpanan sperma. Hal ini sesuai dengan rujukan [12] tentang aplikasi bioteknologi inovatif dengan menggunakan sperma ikan patin dihasilkan data volume sperma 2 ml – 16 ml, dengan konsentrasi spermatozoanya $9,4 \times 10^9$ sel sperma/ml, motilitasnya 70% - 99%. Menurut Fujaya, 2002 dengan pH sperma yang dapat digunakan untuk penyimpanan adalah sperma yang memiliki pH 7,14-7,85 dan persentase hidup spermatozoa lebih dari 70%.

B. Motilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) yang Disimpan dengan Penambahan Larutan Pengencer

Motilitas spermatozoa ikan patin ditentukan dari banyaknya jumlah spermatozoa yang bergerak dari suatu lapang pandang. Dalam penelitian ini kategori pergerakan spermatozoa diabaikan, artinya semua jenis kategori pergerakan spermatozoa pada saat pengamatan dihitung dan dipersentasikan. Kemudian persentase motilitas spermatozoa ikan patin dianalisis secara statistik dengan uji analisis ragam.

Hasil analisis statistik analisis ragam nilai sig uji F untuk larutan pengencer, waktu penyimpanan dan juga interaksi antara larutan pengencer dan waktu penyimpanan, semuanya adalah 0,00, karena lebih kecil dari taraf sig. 0,05, dapat dikatakan bahwa pengaruh interaksi larutan pengencer dan waktu pengamatan nyata terhadap motilitas spermatozoa. Selanjutnya dilakukan Uji Jarak Duncan agar dapat mengetahui interaksi mana yang memberikan persentase motilitas tertinggi selama masa penyimpanan.

Tabel 2.
Persentase motilitas spermatozoa ikan patin dengan penambahan larutan pengencer selama masa penyimpanan.

| Perlakuan Pemberian Larutan Pengencer | Motilitas (%) | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Waktu Pengamatan | | | | | | | |
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
| D0 | 77,78 ^l | 56,43 ⁱ | 20,8 ^e | 10,66 ^d | 9,08 ^d | 3,41 ^b | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| D1 | 77,66 ^l | 67,12 ^k | 38,8 ^g | 30,45 ^f | 17,9 ^e | 5,27 ^c | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| D2 | 82,1 ^m | 75,2 ^l | 38,4 ^g | 18,93 ^e | 10,1 ^d | 5,32 ^c | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| D3 | 83,7 ^m | 72,37 ^l | 45,99 ^h | 38,89 ^g | 17,2 ^e | 6,84 ^c | 1,11 ^{ab} | 0,00 ^a |
| D4 | 78,3 ^l | 62,15 ^j | 37,9 ^g | 28,13 ^d | 11,3 ^d | 4,2 ^c | 0,6 ^b | 0,00 ^a |

Ket : Huruf dalam superscript pada kolom menunjukkan perbedaan nyata antar interaksi

Berdasarkan tabel 2. terlihat bahwa persentase motilitas yang diikuti dengan superscript huruf "a" adalah persentase motilitas terendah dan persentase motilitas yang diikuti dengan superscript huruf "m" adalah persentase motilitas spermatozoa paling tinggi pada interaksi perlakuan dan lama penyimpanan. Superscript huruf m antara lain interaksi D3*T1 dan D2*T1. D3*T1 dan D2*T1 merupakan interaksi yang dapat menghasilkan persentase motilitas spermatozoa terbaik jika dibandingkan dengan interaksi yang lainnya.

Saat spermatozoa berada diluar testis, spermatozoa membutuhkan nutrisi untuk bertahan hidup. Rujukan [16] menyatakan komposisi cairan sperma organik (seminal plasma) dari *catfish* dan *carp* mempunyai energi substrat seperti glukosa dan fruktosa, piruvat, malat dan bahan lainnya dalam jumlah yang kecil pada spermatozoa. Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan madu sebagai nutrisi pada spermatozoa. Nutrisi yang disumbangkan oleh madu terutama berupa glukosa dan fruktosa yang dipakai sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup dan motilitas spermatozoa. Dalam keadaan normal energi yang dilepaskan dapat dipakai sebagai energi mekanik (pergerakan) atau sebagai energi kimiawi (biosintesa), jika tidak dipergunakan akan hilang sebagai panas. Apabila persediaan energi habis, maka kontraksi fibril-fibril spermatozoa akan terhenti dan spermatozoa tidak bergerak. Untuk melangsungkan pergerakan kembali, ATP dan ADP harus dibangun kembali dengan penambahan gugusan phosphoryl yang membutuhkan sumber energi dari luar [17]. Metabolisme gula sederhana ini melalui respirasi sel spermatozoa menghasilkan ATP.

Penguraian ATP menjadi ADP dalam membran dalam mitokondria menghasilkan energi untuk motilitas spermatozoa [18]. Motilitas spermatozoa terjadi karena adanya gerakan dari flagel yang terdiri dari mikrotubul. Gerak flagel merupakan gerak geseran antara doublet dengan perantara dynein. Dynein memiliki gugus yang berperan sebagai ATPase yang bertanggung jawab terhadap terjadinya hidrolisis ATP. Dynein melakukan siklus pergerakan karena tersedianya ATP yang dihasilkan oleh mitokondria [19]. ATP yang dihasilkan oleh mitokondria diaktifkan oleh enzim ATPase untuk melepaskan ikatan fosfat pertama sehingga terbentuklah ADP dan fosfat anorganik dengan melepas energi untuk kontraksi fibril. Bila persediaan fosfat dalam ATP dan ADP telah habis, kontraksi fibril spermatozoa akan berhenti dan gerakan juga berhenti. Motilitas dapat terus berlangsung jika ADP dan ATP dibangun kembali dengan menambahkan kelompok fosfat dari sumber energi berupa bahan organik seperti karbohidrat dan lemak [9].

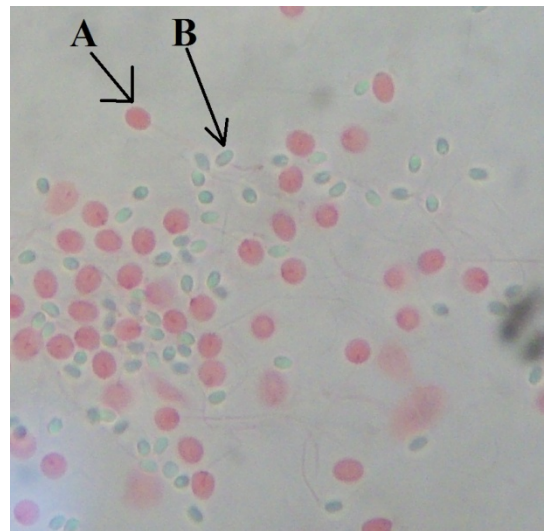
Pada awal waktu penyimpanan (T1) persentase motilitas spermatozoa tinggi dan turun pada selama penyimpanan hingga T8, artinya semakin lama proses penyimpanan sperma persentase motilitas spermatozoa juga semakin menurun. Interaksi yang memiliki persentase motilitas spermatozoa rendah seperti pada waktu pengamatan T7 dan T8 diseluruh perlakuan. Hal ini diduga karena tidak adanya nutrisi tambahan yang ditambahkan dikarenakan nutrisi yang diberikan oleh larutan pengencer telah habis digunakan. Interaksi D3*T1 dan D2*T1 mampu menghasilkan persentase motilitas spermatozoa dikarenakan nutrisi yang disediakan larutan pengencer masih ada untuk digunakan spermatozoa. Pemberian air madu dengan konsentrasi yang lebih besar tidak sesuai sebagai media hidup karena sel spermatozoa dapat tetap melakukan metabolisme secara maksimal bila pengencer bersifat isotonik. Membran sel bersifat semipermeable sehingga baik pengencer yang bersifat hipotonik ataupun hipertonik akan mempengaruhi transfer air melalui membran dan menyebabkan rusaknya integritas sel [20]. Air mempunyai fungsi penting dari sistem hidup karena bagian terbesar dari tiap sel adalah air dan kebanyakan materi kimiawi yang ada larut didalamnya sehingga terjadi reaksi. Kadar air dalam sitoplasma akan mengganggu metabolisme dan mempengaruhi ketahanan hidup sel karena ketahanan hidup tergantung dari keseimbangan penyerapan dan pelepasan air [19]. Selain berkurangnya energi, penurunan persentase motilitas spermatozoa selama penyimpanan terjadi karena berkurangnya oksigen. Selama penyimpanan wadah yang digunakan untuk menampung sperma dan larutan pengencer adalah tabung eppendorf yang ditutup rapat dan disimpan dalam lemari es. Selama penyimpanan, spermatozoa terus melakukan aktivitas yang membutuhkan energi. Energi untuk yang berasal dari plasma sperma maupun pengencer yang ditambahkan. Metabolisme spermatozoa dapat berlangsung secara aerob maupun anaerob. Ketika terdapat oksigen, metabolisme fruktosa 9 kali lebih efisien dalam menghasilkan energi dan dimetabolisir secara sempurna menjadi $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ [17]. Sebaliknya, jika ketersediaan oksigen tidak mencukupi maka metabolisme spermatozoa akan berjalan secara anaerob. Metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerob menghasilkan asam laktat yang mengakibatkan penurunan pH di lingkungan sperma [21]. Pada kondisi lingkungan yang

asam, daya gerak spermatozoa akan menurun. Peningkatan konsentrasi laktat melebihi batas toleransi dapat menyebabkan kematian [22].

Pada penelitian ini dihasilkan persentase motilitas yang masih layak dipakai untuk inseminasi buatan hanya sampai 18 jam (T3) pada perlakuan D3, karena standar motilitas yang banyak digunakan dalam program inseminasi buatan harus memiliki persentase motilitas paling sedikit 40% [21]. Setelah 18 jam atau pengamatan jam ke-3 rata-rata motilitas spermatozoa ikan patin terjadi penurunan motilitas hingga <40% sehingga tidak layak digunakan untuk inseminasi buatan.

C. Viabilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) yang Disimpan dengan Penambahan Larutan Pengencer

Persentase spermatozoa yang hidup ditentukan berdasarkan penyerapan zat warna *eosin* yang dicampurkan pada sperma. Apabila spermatozoa mati, akan menyerap zat warna yang ada disekitarnya sedangkan yang hidup tidak menyerap zat warna. Pada Gambar 1, ditunjukkan perbedaan antara sperma yang hidup dengan yang mati dengan indikator warna *eosin* yang diserap sperma mati. Pada sel yang mati akan terjadi kerusakan membran plasmanya dan selanjutnya akan menyerap zat warna. Sel yang telah menyerap zat warna akan terjadi pembengkakan [23]. Hal tersebut sesuai dengan hasil pengamatan pada penelitian ini yaitu tampak spermatozoa yang terwanai bagian *head piece* – nya lebih besar daripada *head piece* spermatozoa yang transparan (tidak terwanai).



Gambar 1. Pewarnaan spermatozoa menggunakan *eosin*, pengamatan dengan mikroskop *compound* dengan perbesaran 1000 X. Tanda panah (a) adalah sperma mati dan tanda panah (b) adalah sperma hidup.

Pemeriksaan viabilitas berguna untuk mengetahui sampai berapa lama spermatozoa tersebut hidup (*viable*) atau tidak hidup (*unviable*) yang pada penampakan spermatozoa tidak bergerak atau imotil dalam proses penyimpanan dengan penambahan larutan pengencer. Spermatozoa yang imotil belum tentu spermatozoa tersebut sudah mati. Lingkungan yang tidak sesuai akan menyebabkan spermatozoa tidak mampu bergerak tetapi jika spermatozoa tersebut berada lingkungan yang mendukung maka spermatozoa tersebut akan bergerak kembali [14]. Hasil analisis statistik dari analisis

ragam terlihat bahwa nilai sig uji F untuk larutan pengencer, waktu penyimpanan dan juga interaksi antara larutan pengencer dan waktu penyimpanan, semuanya adalah 0,00, karena lebih kecil dari taraf sig. 0,05, dapat dikatakan bahwa pengaruh interaksi larutan pengencer dan waktu pengamatan nyata terhadap viabilitas spermatozoa. Selanjutnya dilakukan Uji Jarak Duncan agar dapat mengetahui interaksi mana yang memberikan persentase motilitas tertinggi selama masa penyimpanan.

Tabel 3.

Persentase viabilitas spermatozoa ikan patin dengan penambahan larutan pengencer selama masa penyimpanan.

| Perlakuan Pemberian Larutan Pengencer | Viabilitas (%) | | | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | Waktu Pengamatan | | | | | | | |
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
| D0 | 78,7 ^m | 73,4 ^l | 67,8 ^j | 57,2 ^h | 35,6 ^e | 24,8 ^b | 29,2 ^c | 18,7 ^a |
| D1 | 87,8 ⁿ | 77,8 ^m | 61,7 ⁱ | 61,9 ⁱ | 52,4 ^d | 52,7 ^d | 32,9 ^d | 23,3 ^b |
| D2 | 85,3 ⁿ | 76,1 ^{lm} | 70,7 ^k | 64,9 ^j | 45,1 ^f | 44,9 ^f | 37,1 ^e | 31,3 ^d |
| D3 | 94,5 ^o | 81,4 ^m | 71,5 ^{kl} | 57,1 ^h | 50,8 ^g | 50,02 ^g | 43,7 ^f | 29,5 ^c |
| D4 | 92,6 ^o | 86,7 ⁿ | 74,9 ^l | 58,2 ^{hi} | 48,6 ^{fg} | 43,7 ^f | 36,6 ^e | 28,3 ^c |

Ket : Huruf dalam superscript pada kolom menunjukkan perbedaan nyata antar interaksi

Ketahanan hidup (viabilitas) spermatozoa terlihat pada tabel 3. interaksi D3*T1 dan D4*T1 yang memberikan persentase viabilitas tertinggi dari seluruh interaksi larutan pengencer dan lama penyimpanan. Persentase viabilitas spermatozoa pada penelitian ini masih dapat bertahan hingga selama 48 jam, padahal kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis hanya berkisar antara 1-2 menit [24]. Penambahan pengencer larutan pengencer yang dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa dengan memberikan nutrisi sumber energi. Pada proses penyimpanan spermatozoa diperlukan bahan pengencer yang tidak hanya sebagai bahan pengencer sperma saja tetapi juga harus mampu berfungsi sebagai penyedia sumber nutrisi bagi spermatozoa sehingga fungsionalitas dan kapabilitas spermatozoa dapat dipertahankan [6]. Dalam penelitian ini larutan pengencer NaCl fisiologis dengan madu merupakan bahan pengencer sperma dengan kombinasi bahan dasar gula dan ion-ion garam Larutan NaCl memberi sifat buffer, mempertahankan pH sperma yang dapat memperpanjang umur spermatozoa, karena bersifat isotonis dengan cairan sel [7]. Madu pada penelitian ini mengandung gula pereduksi sebanyak 67,84% yang terdiri dari fruktosa dan glukosa. Kandungan gula pereduksi ini digunakan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dan juga madu mengandung mineral. Bahan utama yang dipakai spermatozoa sebagai sumber energi dari luar testis adalah fruktosa yang diubah menjadi asam laktat dan energi dengan bantuan enzim fruktolisin dalam proses glikolisis [17]. Rujukan [18] menyatakan gula pereduksi tersebut dapat dimetabolisme oleh spermatozoa untuk menghasilkan energi berupa ATP. Selanjutnya spermatozoa memanfaatkan ATP sebagai sumber energi dalam mempertahankan daya hidupnya. Terdapat unsur-unsur elektrolit seperti Na, Ca, K berfungsi sebagai *cryoprotectant* di dalam pengencer [25].

Perlakuan d0 yang merupakan bahan pengencer dari NaCl fisiologis tanpa menggunakan madu memiliki viabilitas spermatozoa yang terendah karena diduga perlakuan ini tidak ada bahan penutrisi spermatozoa untuk melakukan

metabolisme untuk mempertahankan hidupnya jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya yang menggunakan madu. Interaksi D3*T1 dan D4*T1 dalam penelitian ini memberikan hasil persentase viabilitas yang tertinggi dikarenakan masih tersedianya nutrisi yang diberikan oleh larutan pengencer. Pada interaksi yang lainnya memberikan efek pada penyimpanan spermatozoa yang tidak terlalu bisa mempertahankan ketahanan hidup spermatozoa, hal ini diduga sehingga sumber energi yang dibutuhkan spermatozoa kurang tercukupi untuk bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama.

Seperti halnya pada persentase motilitas yaitu pada awal waktu penyimpanan (T1) tinggi dan turun pada selama penyimpanan hingga akhir penyimpanan (T8), artinya semakin lama proses penyimpanan sperma persentase motilitas spermatozoa juga semakin menurun. Pada waktu pengamatan T1 hingga T3 perlakuan D4 memiliki persentase viabilitas spermatozoa tertinggi dalam penyimpanan. Hal yang sama begitu pula terjadi pada waktu pengamatan T4 perlakuan D2, waktu pengamatan T5 dan T6 perlakuan D1, waktu pengamatan T7 dan T8 perlakuan D3. Hal ini disebabkan energi yang ada pada media pengencer terus menerus berkurang karena digunakan oleh spermatozoa untuk terus menerus metabolisme seiring dengan lama penyimpanan. Lama hidup spermatozoa yang telah dikeluarkan dari testis sangat tergantung dari persediaan energi yang terkandung dalam tubuh sperma tersebut [5]. Bahan utama yang dipakai spermatozoa sebagai sumber energi dari luar testis adalah fruktosa yang diubah menjadi asam laktat dan energi dengan bantuan enzim fruktolisin dalam proses glikolisis. Penurunan persentase hidup dalam proses penyimpanan dapat juga disebabkan oleh metabolisme spermatozoa yang menghasilkan produk samping berupa asam laktat dan atau CO₂ [17]. Asam laktat dapat menghambat aktifitas metabolisme spermatozoa. Sperma yang basa atau asam akan menurunkan metabolismenya [26].

Pada penelitian ini pengamatan viabilitas menunjukkan seluruh konsentrasi pengencer yang digunakan untuk menyimpan sperma ikan Patin (*Pangasius pangasius*) berhasil mempertahankan hingga jam ke-48 pengamatan (bahkan bisa lebih) dengan rata-rata persentase 26,23%. Tetapi dilain pihak rata-rata persentase motilitas pada penelitian ini hanya bisa bertahan rata-rata pada jam ke-36 pengamatan, hanya perlakuan D3 dan D4 saja yang dapat mempertahankan motilitas hingga jam ke-42 pengamatan. Hal ini dapat dikatakan walaupun ketahanan hidup spermatozoa bisa bertahan lama akan percuma jika tidak memiliki daya pergerakan yang cukup untuk membuahi pada Inseminasi Buatan (IB) pada hewan kelas ikan.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Penggunaan larutan pengencer yang terbuat dari campuran madu dan NaCl fisiologis sebagai dalam penyimpanan sperma ikan patin (*Pangasius pangasius*) berpengaruh terhadap pergerakan (motilitas) dan ketahanan hidup (viabilitas)

spermatozoa ikan patin tetapi tidak bisa digunakan untuk inseminasi buatan karena persentase motilitas yang masih layak dipakai untuk inseminasi buatan hanya hingga 18 jam (T3) pada perlakuan D3, karena standar motilitas yang banyak digunakan dalam program inseminasi buatan harus memiliki persentase motilitas paling sedikit 40%.

Pada penelitian terdapat interaksi antara pemberian larutan pengencer dan lama penyimpanan yang memberikan hasil persentase motilitas dan viabilitas yang tinggi. Persentase motilitas spermatozoa ikan patin paling baik terdapat pada larutan pengencer D3 (99,4 ml larutan NaCl fisiologis dan madu 0,6 ml) dan larutan pengencer D2 (99,6 ml larutan NaCl fisiologis dan madu 0,4 ml) pada pengamatan T1 (6 jam). Dan persentase viabilitas spermatozoa ikan patin paling baik terdapat pada larutan pengencer D3 (99,4 ml larutan NaCl fisiologis dan madu 0,6 ml) dan larutan pengencer D4 (99,2 ml larutan NaCl fisiologis dan madu 0,8 ml) pada pengamatan T1 (6 jam).

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan spermatozoa dalam proses fertilisasi setelah proses penyimpanan. Mencari bahan pengencer alami yang bernutrisi lain yang dapat digunakan sebagai cadangan energi spermatozoa contohnya sari-sari buah yang memiliki kadar glukosa atau fruktosa yang cenderung tinggi. Dilakukan pengamatan MPU (membran plasma utuh) yaitu dengan metode *osmotic resistance test* (ORT) atau *hypoosmotic swelling* (HOS).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Khairuman dan D. Sudenda, *Budidaya Patin Secara Intensif*. Jakarta : Agro Media Pustaka. (2002).
- [2] K. Amri dan S.P. Khairuman, *Budidaya Perikanan pada Tiap Jenis Ikan*. Jakarta : Agro Media Pustaka. (2008).
- [3] Rustidja. *Prospek Pembekuan Sperma*. Malang: Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya (2000).
- [4] S. Kwantong dan A.N. Bart, Effect of Cryoprotectants, Extenders and Freezing Rates on The Fertilization Rate of Frozen Striped Catfish, *Pangasius Hypophthalmus* (Sauvage), Sperm. *Aquaculture Research*, 34, (2003) 887-893.
- [5] Y. Fujaya, *Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan, Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi*. Jakarta: Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional. (2002).
- [6] A. Sunarma, D.W.B. Hastuti, dan Y. Sistina, *Penggunaan Ekstender Madu Yang Dikombinasikan Dengan Kriprotektan Berbada Pada Pengawetan Spermatikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, Osteochilus Hasseltiivalenciennes, 1842)*. Konferensi Aquaculture Indonesia (2007).
- [7] Nilna, *Standar Operasional Pekerjaan Prosesing Semen*. Sumatera Barat: Dinas Peternakan Propinsi (2010).
- [8] N. Isnaini dan Suyadi, "Kualitas Semen Ayam Kedu pada Suhu Kamar dalam Pengencer Larutan NaCl Fisiologis dan Ringer's," *J. Ternak Tropika*, Vol. 1, No. 2 (2000) 55-56.
- [9] C.W. Salisbury dan N.L. Van Demark, *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*, Yogyakarta: Gajah Mada University Press. (1985).
- [10] Pusat Perlebahan APIARI Pramuka (PPAP), *Lebah Madu, Cara Beternak dan Pemanfaatan*. Penerbit Jakarta: Penebar Swadaya. (2003).
- [11] M.G.H. Kordi, *Budidaya Ikan Patin Di Kolam Terpal*. Yogyakarta: Lily Publisher. (2010).
- [12] P. C. Chew, Z.A. Rashid, R. Hassan, Application Of innovative Biotechnologies Regarding Aquaculture And fisheries Sector In Malaysia: Cryopreservation Programme. *Freshwater Fisheries Research center*. (2010).
- [13] E. Rurangwaa, D.E.F. Kimeb, dan J.P.N. Olleviera, "The Measurement Of Sperm Motility And Factors Affecting Sperm Quality In Cultured Fish," *Aquaculture*, Vol. 234 (2004) 1-28.
- [14] O.P. Sono, *Diktat Kuliah Analisa Sperma*, Surabaya: Laboratorium Biomedik FK UNAIR. (1978).
- [15] R.G.D Steel, dan J.H. Torrie, *Prinsip dan Prosedur statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa : Sumantri B.* Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. (1993).
- [16] Y. Adipu, H. Sinjal dan J. Watung, "Ratio Pengenceran Sperma Terhadap Motilitas Spermatozoa, Fertilitas dan Daya Tetas Ikan Lele (*Clarias* sp.)," *Jurnal Perikanan dan Kelautan tropis* Vol. 7 Np. 1 (April 2011, Apr.) 48-55.
- [17] Hidayaturrahmah, Waktu Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus Carpio* L) Pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa," *Bioscientiae*, Vol. 4 (2007) 9-18.
- [18] J. Labetubun dan I.P. Siwa, "Kualitas Spermatozoa Kauda Epididimis Sapi Bali dengan Penambahan Laktosa atau Maltosa yang Dipreservasi pada suhu 3-5°C," *Jurnal Veteriner September*, Vol. 12 No. 3 (2011) 200-207
- [19] J. B. Campbell, L.G. Reece dan Mitchell, *Biologi. (Edisi kelima. Jilid 3)*, Jakarta : Penerbit Erlangga. (2004).
- [20] D.F. Souhoka, M.J. Mataluta, W.M.M. Nalley dan M. Rizal, "Laktosa Mempertahankan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan," *Jurnal Veteriner September*, Vol. 10, No 3 (2009) 135-142.
- [21] M .R. Toelihere, *Inseminasi Buatan Pada Ternak*, Bandung: Penerbit Angkasa. (1993)
- [22] A. Wicaksono, dan R.I. Arifiantini, "Uji Banding Empat Bahan Pengencer untuk Preservasi Semen Anjing Retriever," *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, Vol.14, No 1 (2009) 50-57.
- [23] H. Wibisono, *Panduan Laboratorium Andrologi, Buku Pertama*, Bandung: PT. Refika Aditama. (2010).
- [24] M.I. Effendie, *Metode Biologi Perikanan*, Bogor: Yayasan Pustaka Dwi Sri (1997).
- [25] N. Solihati, "Studi Terhadap Kualitas Dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Cauda Epididimidis Domba Garut Menggunakan Berbagai Jenis Pengencer," In *Proc. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*, Puslitbang Peternakan, Bandung (2008) 401-408.
- [26] S. Hardjopranoto, *Ilmu Kemajiran pada Ternak*.Airlangga. Surabaya: University Press. (1995).