



Pengaruh Perbedaan Durasi Waktu Thawing terhadap Tingkat Motilitas dan Tingkat Viabilitas Sperma Beku Kerapu Kertang *Epinephelus lanceolatus*

Adi Wiranto¹, Henky Irawan¹, Muzahar¹

¹Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Maritim Raja Ali Haji.

INFO NASKAH

ABSTRAK

Kata kunci:

Durasi,
Kerapu Kertang,
Motil,
Sperma Beku,
Thawing

Pembuatan sperma beku ikan kerapu kertang (*E. lanceolatus*) telah berhasil dilakukan untuk mendukung produksi kerapu *hybrid* di Indonesia. Thawing sperma beku merupakan salah satu kunci dalam keberhasilan pembuahan, namun penelitian tentang pengaruh durasi waktu thawing terhadap tingkat motilitas dan tingkat viabilitas sperma beku ikan kerapu kertang (*E. lanceolatus*) belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh perbedaan durasi waktu thawing sperma beku ikan kerapu kertang (*E. lanceolatus*) untuk mengetahui tingkat motilitas dan tingkat viabilitas sperma. Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2020 di Balai Perikanan Budidaya Laut Batam, Kota Batam, Provinsi Kepulauan Riau. Metode yang digunakan adalah eksperimental Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan yaitu 3 detik, 9 detik, 15 detik, 21 detik. Analisis data menggunakan ANOVA dan uji lanjut Duncan's menunjukkan motilitas terbaik terjadi pada 21 detik (69,99±4,74), viabilitas sperma terbaik terjadi pada 21 detik (54,29±1,76). Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan perlakuan 21 detik merupakan perlakuan terbaik.

Gedung FIKP Lt. II Jl. Politeknik Senggarang, 29115, Tanjungpinang, Telp : (0771-8041766, Fax. 0771-7004642. Email: 160254243025@student.umrah.ac.id, henkyirawan@umrah.ac.id, muzahar@umrah.ac.id.

Effect of Different Thawing Durations on Motility Rate and Viability Rate of Cryopreserved Sperm Giant Grouper *Epinephelus lanceolatus*

Adi Wiranto, Henky Irawan, Muzahar

Department of Aquaculture, Faculty of Marine Science and Fisheries, Raja Ali Haji Maritime University.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:

Cryopreserved Sperm,
Duration,
Giant Grouper,
Motile,
Thawing

The production of cryopreserved sperm giant grouper has been successfully carried out to support produced hybrid grouper in Indonesia. Thawing cryopreserved sperm is one of key to successfully insemination. However, research on the effect of thawing time of cryopreserved sperm giant grouper (*E. lanceolatus*) on motility rate and viability rate has not been conducted. This research aims to determine the effect of different duration thawing of cryopreserved sperm giant grouper (*E. lanceolatus*) on motility rate and viability rate. This research was conducted in December 2020 at Batam Marine Aquaculture Fisheries Center, Batam City, Kepulauan Riau Province. The method used was experimental completely randomized design (CRD) with 4 treatments and 3 replications, namely 3 seconds, 9 seconds, 15 seconds, 21 seconds. Data analysis used ANOVA and Duncan's continued test showed that the best motility happened in 21 seconds (69,99±4,74), the best sperm viability happened in 21 seconds (54,29±1,76). The results obtained indicate that 21 seconds is the best treatment.

Gedung FIKP Lt. II Jl. Politeknik Senggarang, 29115, Tanjungpinang, Telp : (0771-8041766, Fax. 0771-7004642. Email: 160254243025@student.umrah.ac.id, henkyirawan@umrah.ac.id, muzahar@umrah.ac.id.



PENDAHULUAN

Ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) merupakan salah satu jenis ikan kerapu yang tidak memiliki nilai ekonomis di pasar domestik Indonesia tetapi spermatozoa ikan kerapu kertang memiliki nilai ekonomis sebagai bahan utama menghasilkan kerapu *hybrid*. Salah satu jenis ikan kerapu *hybrid* yang sudah dapat diproduksi untuk memasok kebutuhan budidaya di Indonesia adalah ikan kerapu cantang hasil persilangan antara ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) betina dan ikan kerapu kertang (*E. lanceolatus*) jantan (Ismi & Asih, 2011) dengan kemampuan pertumbuhan lebih cepat serta tahan terhadap penyakit, dan ikan kerapu tiktang hasil persilangan antara ikan kerapu batik (*E. microdon*) betina dan ikan kerapu kertang (*E. lanceolatus*) jantan (Muslim *et al.*, 2019).

Salah satu upaya yang bisa dilakukan untuk membantu memproduksi kerapu *hybrid* di Indonesia melalui teknik pembekuan sperma (*cryopreservation*). Teknik pembekuan ini lebih mudah karena dalam melakukan pemijahan buatan tidak membutuhkan induk serta mudah diaplikasikan. Penanganan pemijahan buatan mempunyai peran besar dalam keberhasilan pemijahan buatan, karena prosedur pelaksanaan pemijahan buatan mulai dari pengamatan induk, penanganan sperma beku, pencairan sperma beku (*thawing*) sangat mempengaruhi keberhasilan perkawinan (Hoesni, 2014). Selain teknik *cryopreservasi*, teknik pencairan sperma beku merupakan prosedur yang penting dalam inseminasi buatan karena penggunaan metode pencairan yang tidak tepat akan menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas spermatozoa. sehingga mengakibatkan penggunaan suhu dan waktu pada pencairan sperma beku di lapangan sangat beragam (Hoesni, 2014).

Penelitian tentang teknik pembekuan sperma pada ikan kerapu kertang telah berhasil dilakukan (Fan *et al.*, 2013; Pratiwi *et al.*, 2019; Sudrajat *et al.*, 2019; Widyaningsih *et al.*, 2019; BPBL Batam *unpublished*). Salah satu kendala yang dihadapi dalam prosedur pembekuan sperma adalah angka motilitas dan viabilitasnya tidak tentu disebabkan prosedur *thawing* yang bervariasi (Bozkurt & Yavas, 2017), oleh karena itu pemanfaatan suhu dan waktu pada saat *thawing* sperma beku perlu dilakukan seperti pada spesies *Epinephelus akaara* (He *et al.*, 2011), spesies *Ctenopharyngodon idella* (Yavas & Bozkurt 2011), spesies *Bocachico prochilodus magdalenae* (Martínez & Pardo, 2013), spesies *Ciprinus carpio* (Bozkurt & Yavas, 2017), durasi yang tepat untuk pencairan sperma beku ikan kerapu kertang belum diketahui.

Penelitian penggunaan durasi waktu yang berbeda pada *thawing* sperma beku ikan kerapu kertang untuk mengetahui penggunaan durasi waktu terbaik dalam menentukan tingkat motilitas serta viabilitas spermatozoa penting dilakukannya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2020 di Balai Perikanan Budidaya Laut Batam (BPBL Batam), Pulau Setokok, Kota Batam Provinsi Kepulauan Riau. Alat yang digunakan yaitu styrofoam, mikroskop (Olympus BX-53), komputer (Dell), *container nitrogen*, stopwatch, gunting, tisu gulung, ember, pipet tetes, kaca preparat, cover glass, Waterbath, penjepit, tisu, teko, botol. Bahan



yang digunakan adalah *straw* sperma beku kerapu kertang (0,5 ml), nitrogen cair, air laut, eosin, air tawar. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan menggunakan *straw* masing masing percobaan 0,5 ml mengacu pada penelitian (BPBL Batam *unpublished*, dan modifikasi metode Kiriyaakit *et al.* 2011), Adapun perlakuannya adalah:

1. Kontrol (K): Durasi waktu *thawing* sperma beku selama 3 detik (BPBL Batam *unpublish*)
2. Perlakuan 1 (P1): Durasi waktu *thawing* sperma beku selama 9 detik
3. Perlakuan 2 (P2): Durasi waktu *thawing* sperma beku selama 15 detik (Kiriyaakit *et al.*, 2011)
4. Perlakuan 3 (P3): Durasi waktu *thawing* sperma beku selama 21 detik

Prosedur Penelitian

1. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan penelitian yang digunakan disiapkan lebih dulu sebelum memulai proses *thawing*, fokus mikroskop diatur dengan pembesaran 1000x yang dihubungkan dengan komputer, kemudian suhu air dipanaskan menggunakan *waterbath* pada suhu 37°C di dalam wadah yang berisi air tawar, selanjutnya pewarna *eosin* disiapkan menggunakan botol.

2. Penanganan Sperma Beku

Sperma beku yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari BPBL Batam yang telah dibekukan sebelumnya menggunakan *straw* (0,5 ml) disimpan dalam *container liquid nitrogen* kemudian dipindahkan pada *styrofoam* yang telah diisi dengan nitrogen cair.

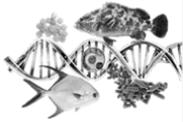
3. *Thawing*

Proses *thawing* atau pengeceran spermatozoa dalam *straw* dilakukan pada suhu 37°C dengan cara 1 *straw* yang diambil dari *container nitrogen* direndam ke dalam wadah air tawar yang telah diatur dengan suhu 37°C, kemudian dihitung waktu menggunakan *stopwatch* sesuai durasi perlakuan, setelah itu sperma diambil menggunakan penjepit, kemudian bagian bawah dari *straw* dipotong menggunakan gunting, selanjutnya spermatozoa diencerkan menggunakan air laut lalu diamati performa spermatozoa menggunakan mikroskop Olympus BX-53 dengan perbesaran 1000x yang tersambung dengan komputer serta dilakukan perekaman untuk meminimalisir bias.

4. Parameter yang diamati

4.1 Motilitas Sperma

Motilitas sperma diamati menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan cara sperma sebanyak 1 tetes dari *straw* diletakkan di kaca preparat dan diaktifkan



dengan air laut sebanyak 1 tetes dari pipet tetes kemudian ditutup menggunakan *coverglass* kemudian diamati dan dilakukan perekaman. Perhitungan motilitas sperma berasal dari rekaman video pengamatan dan dihitung menggunakan perangkat lunak ImageJ OpenCASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) menu *Motility Analysis* dengan pengaturan *default*, sperma katagori motil apabila nilai *Curvilinear velocity* (VCL) $> 5 \mu\text{m/s}$ (Fan *et al.*, 2013) dan *Average-path velocity* (VAP) < 120 yang terdeteksi olen OpenCASA (Alque'zar-Baeta *et al.*, 2019).

4.2 Viabilitas Sperma

Pengukuran viabilitas sperma dilakukan dengan cara sperma sebanyak 1 tetes dari *straw* dicampur dengan 1 tetes pewarna eosin dari pipet tetes kemudian menggunakan *coverglass*. Perhitungan viabilitas sperma berasal dari rekaman video pengamatan dan dihitung menggunakan perangkat lunak ImageJ OpenCASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) dengan menu *Viability Analysis* pengaturan *default* (Alque'zar-Baeta *et al.*, 2019).

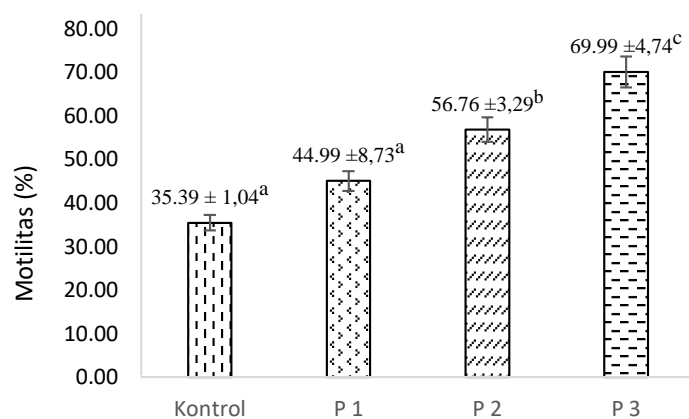
5. Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan interval kepercayaan 95 % dan jika terdapat perbedaan nyata dilakukan uji lanjut *Duncan* dengan perangkat lunak SPSS 22.0.

Hasil

A. Motilitas Sperma

Motilitas sperma adalah persentase jumlah sperma yang bergerak pasca *thawing* dalam periode waktu tertentu. Nilai motilitas sperma disajikan dalam bentuk diagram seperti ditampilkan pada gambar 1.



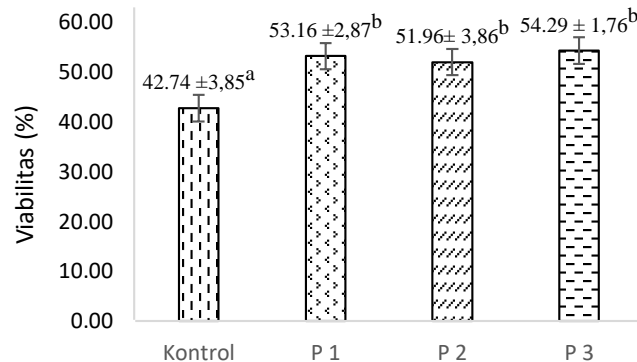
Gambar 1. Motilitas sperma beku kerapu kertang (Keterangan: Kontrol: 3 detik, P1: 9 detik, P2: 15 detik, P3: 21 detik).

Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa durasi waktu *thawing* memberikan pengaruh nyata terhadap motilitas sperma beku ikan kerapu kertang ($P < 0,05$). Hasil penelitian motilitas sperma terbaik berturut turut adalah P3 (69,99±4,74), P2 (63,35±6,11), P1 (43,68±11,92), K (35,39±1,04).



B. Viabilitas Sperma

Viabilitas sperma adalah persentase jumlah sperma hidup yang diamati pasca *thawing* dengan kategori sperma hidup tidak mampu menyerap bahan pewarna. Nilai viabilitas sperma disajikan dalam bentuk diagram ditampilkan pada gambar 2.



Gambar 2. Viabilitas sperma beku kerapu kertang (Keterangan: Kontrol: 3 detik, P1: 9 detik, P2: 15 detik, P3: 21 detik).

Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa durasi waktu *thawing* memberikan pengaruh nyata terhadap viabilitas sperma beku ikan kerapu kertang dengan ($P < 0,05$). Hasil penelitian viabilitas sperma beku terbaik berturut turut adalah P3 ($54,29 \pm 1,76$), P1 ($53,16 \pm 2,87$), P2 ($51,96 \pm 3,86$), K ($42,74 \pm 3,85$).

PEMBAHASAN

Faktor yang mempengaruhi tingkat motilitas sperma beku adalah durasi serta suhu yang digunakan pada saat *thawing* karena penggunaan durasi serta suhu yang tidak tepat bisa menyebabkan terciptanya kristal es pada spermatozoa sehingga menyebabkan sperma mengalami kerusakan (Leung, 1991). Pelaksanaan *thawing* dianjurkan untuk dilakukan secara cepat dengan kombinasi antara suhu dan durasi perendaman yang sesuai untuk mencegah terbentuknya kristal es (*re-crystallization*) (Yang & Tiersch, 2009). Menurut Yavas & Bozkurt (2011) penggunaan suhu terbaik dalam pelaksanaan *thawing* berkisar antara $30^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C}$. Menurut Lahnsteiner (2000) rasio penggunaan *diluent* dan sperma dalam pembuatan *dilution* berpengaruh terhadap sperma yang dibekukan, serta perbedaan spesies juga akan mempengaruhi rasio *dilution* yang digunakan. Fan *et al.* (2013) menyatakan rasio perbandingan *dilution* yang berbeda bisa mempengaruhi tingkat motil sperma ikan kerapu kertang. Selain itu, penggunaan larutan pengenceran juga bisa mempengaruhi performa motil sperma (Tumanung *et al.*, 2015).

Bila dibandingkan dengan penelitian Fan *et al.* (2013), penggunaan *cryoprotectant* jenis *dimethyl sulfoxide* dan ekstender jenis MPRS memiliki tingkat motilitas yang besar yaitu lebih dari 90% sedangkan pada hasil data yang didapatkan motilitas tertinggi hanya mencapai $69,99 \pm 4,74$ %. Hal ini diduga penggunaan *dilution* (*cryoprotectant* + ekstender) yang berbeda menyebabkan kemampuan *dilution* dalam mempertahankan kondisi sperma sebenarnya juga



berbeda. Menurut Penaranda *et al.* (2009), penggunaan *cryoprotectant* terutama DMSO meningkatkan osmolalitas yang memberikan pengaruh terhadap motilitas sperma pasca *thawing*. Penggunaan *cryoprotectant* yang berbeda juga mampu memberikan pengaruh terhadap motilitas sperma (Irawan, 2010). Agarwal (2011), menyebutkan bahwa ekstender yang baik adalah ekstender yang telah sesuai pada kondisi seminal plasma spesies tertentu. Idealnya extender yang digunakan bersifat isotonic, memiliki kapasitas penyangga yang baik, nutrisi, antioksidan dan anti bakteri, serta mampu mempertahankan kualitas dengan baik, nilai pH ekstender yang digunakan juga berpengaruh terhadap motilitas sperma, hal ini disebabkan sperma akan bersifat *immotile* saat berada dalam kantung seminal plasma lalu sperma akan aktif ketika kondisi osmolalitas perairan tidak isotonik terhadap kantung seminal plasma (Irawan, 2012; Irawan, 2014). Spermatozoa membutuhkan energi untuk tetap melakukan metabolisme dasar dan saat motil terjadi, ekstender digunakan untuk mendukung energi retensi yang digunakan untuk metabolisme dasar dan motil (Agarwal, 2011).

Perbedaan nilai viabilitas diduga karena durasi *thawing* yang digunakan pada perlakuan K terlalu singkat sehingga tingkat viabilitas sperma perlakuan K mengalami penurunan drastis. Yavas & Bozkurt (2011) menyatakan bahwa prosedur *thawing* sangat penting dalam menjaga viabilitas spermatozoa, prosedur *thawing* yang dilakukan harus ditingkatkan untuk mencejah terjadinya fenomena terbentuknya kristal es (*re-crystallization*). Menurut Agarwal (2011), bahwa suhu yang digunakan saat *thawing* sangat penting terhadap pengaruh viabilitas spermatozoa pasca pendinginan. Perbedaan hasil penelitian Kiriyakit *et al.* (2011) dengan data yang diperoleh terkait viabilitas sperma dari seluruh perlakuan hal ini diduga karena perbedaan jenis ekstender yang digunakan pada pembekuan sperma sebelumnya. Jenis ekstender yang digunakan Kiriyakit *et al.* (2011) yaitu MFR (~ 438 mOsm/kg) hampir mendekati susunan kimiawi seminal plasma ikan kerapu kertang (~ 429 mOsmol/kg) sehingga lingkungan sperma yang isotonik inilah yang menyebabkan sperma *immotile* dengan baik.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian adalah:

1. Penggunaan durasi waktu *thawing* yang berbeda berpengaruh terhadap motilitas sperma, serta viabilitas sperma.
2. Perlakuan P3 (37°C selama 21 detik) *thawing* memberikan hasil terbaik terhadap motilitas sperma, viabilitas.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada kepala dan staff Balai Perikanan Budidaya Laut Batam yang telah membantu berjalannya penelitian terutama Bapak Kadari, Bapak Sahidan Muhlis, Bapak Wibowo, Bapak Anggit.

DAFTAR PUSTAKA

Agarwal NK. 2011. Cryopreservation of Fish Semen. Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology. Transmedia Publication.



Alque'zar-Baeta C, Gimeno-Martos S, Miguel-Jime'nez S, Santolaria P, Ya'niz J, Palacı'n I, *et al.* 2019. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput Biol* 15(1): e1006691.

BPBL Batam. *unpublished*. Balai Perikanan Budidaya Laut. Kriopreservasi Sperma Kerapu Kertang di Balai Perikanan Budidaya Laut Batam.

Fan B, Liu XC. Meng ZN, Tan BH, Wang L, Zhang HF, Zhang Y, Wang YX, Lin HR. 2013. Cryopreservation of Giant Grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch, 1790) sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 30 (2): 334–339.

He Q, Lu G, Che K, Zhao E, Fang Q, Wang H, Liu J, Huang C, Dong Q. 2011. Sperm Cryopreservation of the Endangered Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*, with a Special Emphasis on Membrane Lipids. *Aquaculture*. 318: 185– 190

Hoesni F. 2014. Pengaruh Motilitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Perah Berpengencer Susu Skim dengan Metode Thawing yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi* 14 (4): 80-86.

Irawan H. 2012. Pengaruh Larutan Elektrolit dan Non Elektrolit pada Tingkat Osmolalitas yang berbeda terhadap Motilitas Sel Sperma Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*). *Dinamika Maritim*. 2(1): 1-7.

Irawan H. 2014. Pengaruh pH pada Ekstender terhadap Daya Simpan dan Motilitas sel Sperma Ikan Mas (*Cyprinus. carpio*). *Dinamika Maritim*. 3(2): 30-39.

Irawan H., Vuthiphandcha, V., Nimrat, S. 2010. The Effect of Extenders, Cryoprotectants and Cryopreservation Methods on Common Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm. *Animal Reproduction Science*. 122: 236-243.

Ismi S, Asih YN. 2011. Pengamatan Perkembangan Benih Kerapu Hybrid Persilangan antara Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Kerapu Kertang (*Epinephelus lanceolatus*). *Prosiding Seminar Nasional Kelautan VII*. 100-104.

Kiriyakit A, Wenresti GG, Amrit NB. 2011. Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides x Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm. *Aquaculture* 320: 106-112.

Lahnsteiner F. 2000. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern Pike. *Aquacult. Res.* 31, 245–258.

Leung LKP. Principles of Biological Preservation, in: B.G.M. Jamieson (Ed.), *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*, Cambridge University Press, London, 1991, pp. 231–234.



- Martínez JG, Pardo SC. 2013. Effect of Freezing and Thawing Rates on Sperm Motility in *Bocachico prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). Rev MVZ Córdoba 18 (1): 3295-3303.
- Muslim AB, Wahyuni S, Widodo AP, Pujiati. 2019. Produksi Benih Kerapu Hybrida Tiktang Hasil Persilangan Ikan Kerapu Batik Betina dengan Kerapu Kertang Jantan. Perekayasa Budidaya Air Payau dan Laut. 14: 49-56.
- Penaranda DS, Perez L, Gallego V, Jover M, Asturiano JF. 2009. Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. Cryobiology 59, 119–126.
- Pratiwi TP, Abinawanto A, Lestari R, Bowolaksono A, Zavitri NG. 2019. The Effect of Egg Yolk as Natural Cryoprotectant on Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*) Spermatozoa Motility. Proceedings of the 4th International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences.
- Sudrajat AK, Abinawanto A, Lestari R, Bowolaksono A, Zavitri NG. 2019. The Combination Effect 6 % of Glycerol and Skim Milk on Spermatozoa Motility of Giant Grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch 1970) After Frozen. Proceedings of the 4th International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences.
- Tumanung S, Sinjai HJ, Watung JC. 2015. Penambahan Madu dalam Pengenceran Sperma untuk meningkatkan Motilitas, Fertilisasi, dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). Jurnal Budidaya Perairan. 3(1): 51-58.
- Widyaningsih W, Abinawanto A, Lestari R, Bowolaksono A, Zavitri NG. 2019. Effect of various Concentrations of Palm Date (*Phoenix dactylifera L.*) on Spermatozoa Motility of Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*). Proceedings of the 4th International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences.
- Yang HP, Tiersch TR. 2009. Current Status of Sperm Cryopreservation in Biomedical Research Fish Models: Zebrafish, Medaka, and Xiphophorus. Comp Biochem Physiol 149: 224–232.
- Yavas I, Bozkurt Y. 2011. Effect of Different Thawing Rates on Motility and Fertilizing Capacity of Cryopreserved Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idella*) Sperm. Biotechnol & Biotechnol. 25 (1): 2254-2257.