



## Kriopreservasi sperma ikan kawan *Poropontius tawarensis* menggunakan Dimetil sulfoxida (DMSO)

### *Cryopreservation of kawan fish Poropontius tawarensis sperm using Dimethyl sulfoxide (DMSO)*

Cut Ruhul Muthmainnah<sup>1</sup>, Kartini Eriani<sup>1</sup>, Iwan Hasri<sup>3</sup>, Nur Fadli<sup>2</sup>, Abdulah A. Muhammadar<sup>2</sup>, Zainal A. Muchlisin\*<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia; <sup>2</sup>Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia; <sup>3</sup>Balai Benih Ikan Lukup Badak, Pegasing, Aceh Tengah, Indonesia; <sup>4</sup>Pusat Riset Kelautan dan Perikanan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111, Indonesia. \*Email korespondensi: muchlisinza@unsyiah.ac.id

Received: 26 November 2019

Accepted: 30 December 2019

**Abstract.** *Kawan fish (Poropontius tawarensis) is an endemic fish found in Danau Laut Tawar, Central Aceh, Indonesia. This species has been threatened by ecological perturbation, unfrindly fishing practices and pollution. Cryopreservation is one of the ways to maintain the presence of these fish. Cryoprotectant (CP) is a critical material in the cryopreservation and DMSO is a common CP used in cryopreservation. Hence, the aim of the present study was to determine the optimum DMSO concentration for kawan fish sperm. The completely randomized design with 6 treatments and 3 replications were used in this study. The tested treatment was the difference of DMSO concentration, namely; 0, 3%, 6%, 9%, 12%, and 15% DMSO was combined with 5% egg yolk. The ratio of sperm to diluent is 1: 20. The cryotubes containing diluted sperm were evaporated at 5 cm from the surface of liquid nitrogen for 10 min, then stored in a liquid nitrogen container at -196°C for 2 weeks, then thawed and analyzed for the quality. The results showed that fresh sperm of kawan fish had motility of 48.67%, pH 7, milky white, with moderate consistency. The assessment of mass movements shows that the sperm has good quality. The ANOVA test showed that the addition of DMSO in diluents gave significant effect on sperm motility, fertility and hatchability rates of fish eggs (P <0.05). The highest percentage of sperm motility and fertilization rates of fish eggs were found at concentration of 6%, respectively with the value of 46.67% and 45.67%, respectively. The highest percentage of hatching rate was also found in similar concentration of DMSO with the value of 19.33%. The DNA integrity test using the electrophoresis gel method showed that there was damage to DNA fish sperm after freezing, the the lower damage was found at 9% and 12% DMSO. It is concluded that the optimum concentration of DMSO for kawan fish sperm is at 6% of DMSO.*

**Key words:** *kawan fish (Poropontius tawarensis), cryopreservation, DMSO, DNA integrity*

**Abstrak.** Ikan kawan (*Poropontius tawarensis*) merupakan ikan endemik yang terdapat di Danau Laut Tawar, Aceh Tengah, Indonesia. Menurut IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), ikan ini termasuk ikan yang terancam punah oleh sebab kerusakan lingkungan, penangkapan tidak ramah lingkungan dan polusi. Salah satu cara untuk menjaga keberadaan ikan tersebut adalah dengan penerapan metode kriopreservasi sperma. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi DMSO optimum dan melihat kerusakan DNA yang terjadi pada sperma ikan kawan (*Poropontius tawarensis*) pasca pembekuan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan yang diuji adalah perbedaan konsentrasi DMSO dengan konsentrasi 0; 3%; 6%; 9%; 12% dan 15%. DMSO tersebut dikombinasikan dengan 5% kuning telur. Perbandingan sperma dengan pengencer adalah 1 : 20. Semua *cryotube* yang berisi sperma dan pengencer diuapkan pada jarak 5 cm dari permukaan nitrogen cair selama 10 menit, selanjutnya, disimpan dalam kontainer nitrogen cair bersuhu -196°C untuk disimpan selama 2 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sperma segar ikan kawan memiliki nilai motilitas sebesar 48,67%, pH 7, berwarna putih susu, dengan konsistensi sedang. Penilaian gerakan massa menunjukkan bahwa sperma



tersebut berkualitas baik. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa penambahan DMSO dalam pengencer berpengaruh nyata terhadap motilitas, fertilitas dan daya tetas telur ikan kawan (*Poropuntius tawarensis*) ( $P < 0,05$ ) setelah pembekuan. Selanjutnya, uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa persentase motilitas sperma dan pembuahan telur ikan kawan tertinggi terdapat pada penambahan DMSO dengan konsentrasi 6%, masing-masing sebesar 46,67% dan 45,67%. Persentase penetasan telur tertinggi juga dijumpai pada perlakuan 6% DMSO, dengan nilai 19,33%. Hasil uji integritas DNA menggunakan metode elektroforesis gel menunjukkan bahwa terdapat kerusakan pada DNA sperma ikan pasca pembekuan, Kerusakan yang terendah terdapat pada konsentrasi DMSO 9% dan 12%. Namun secara umum, disimpulkan bahwa konsentrasi optimum untuk kriopreservasi ikan kawan adalah 6% DMSO.

**Kata kunci:** ikan kawan (*Poropuntius tawarensis*), kriopreservasi, DMSO, integritas DNA

## Pendahuluan

Ikan kawan (*Poropuntius tawarensis*) adalah ikan endemik di Danau Laut Tawar, Aceh Tengah (Muchlisin *et al.*, 2010). Ikan ini termasuk ikan yang terancam punah dan telah masuk dalam IUCN Redlist (Wargasasmita, 2002). Muchlisin *et al.* (2011) dan Muchlisin (2008) menjelaskan bahwa saat ini ikan kawan mulai jarang ditemukan di alam akibat kerusakan lingkungan, polusi, introduksi spesies baru dan penangkapan yang tidak ramah lingkungan. Penelitian terkait ikan kawan masih sangat minim dilakukan, beberapa penelitian yang pernah dilaporkan antara lain, hubungan panjang berat dan faktor kondisi (Muchlisin *et al.*, 2010), kebiasaan makan (Muchlisin *et al.*, 2015), DNA barcoding (Muchlisin *et al.*, 2013).

Program konservasi dan pemijahan ikan kawan telah diinisiasi oleh Pemerintah Kabupaten Aceh Tengah, namun upaya ini masih terkendala karena kematangan gonad ikan kawan terjadi pada musim penghujan (Adriansyah, 1988; Muchlisin dan Hasri, 2015). Sehingga pemijahannya tidak dapat dilakukan sepanjang waktu. Oleh karena itu, salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menghadapi masalah tersebut adalah dengan penerapan metode kriopreservasi baik sperma maupun embrio. Melalui metode ini diharapkan pasokan sperma atau embrio dapat tersedia sepanjang waktu sehingga pemijahan dapat dilakukan sepanjang tahun.

Proses kriopreservasi membutuhkan krioprotektan yang berfungsi sebagai pelindung sperma atau embrio selama proses pembekuan. Krioprotektan yang umum digunakan dalam proses kriopreservasi sperma ikan adalah *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) dan kuning telur. DMSO merupakan krioprotektan yang bekerja di dalam sel (*permeating cryoprotectant*), sedangkan kuning telur bekerja di luar sel (*non-permeating cryoprotectant*). Penggunaan kombinasi DMSO dan kuning telur sebagai krioprotektan sudah dilakukan oleh beberapa peneliti pada spesies yang berbeda, misalnya pada *finfish* dan kerang (*shellfish*) (Chao, 2001); ikan batak (*Tor soro*) (Junior *et al.*, 2005); salmon Atlantik (Jodun *et al.*, 2007); *Labeo rohita* (Sarder, 2011); *Salmo salar* (Dziewulska *et al.*, 2011); *Sparus aurata* (Beirao *et al.*, 2011); *Prochilodus magdalenae* (Martinez *et al.*, 2011); dan *Labeo rohita* (Khan, 2015). Kajian mengenai kriopreservasi sperma ikan kawan belum pernah dilakukan, sehingga perlu dilakukan penelitian mengingat pentingnya ikan ini baik dari segi ekonomi maupun konservasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi DMSO optimum dan menganalisa kerusakan DNA yang terjadi pada sperma ikan kawan (*Poropuntius tawarensis*) pasca pembekuan.

## Bahan dan Metode

### Lokasi dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September hingga Desember 2018 di Balai Benih Ikan (BBI) Lukup Badak, Aceh Tengah. Sedangkan analisa DNA dilakukan di Balai Benih Air Payau (BBAP) Ujong Batee, Aceh Besar.

### Rancangan percobaan

Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 3 ulangan. Ekstender yang digunakan adalah larutan Ringer. Perlakuan



yang diuji adalah perbedaan konsentrasi DMSO dengan konsentrasi 0; 3%; 6%; 9%; 12% dan 15%. DMSO tersebut dikombinasikan dengan 5% kuning telur.

### **Prosedur**

Induk ikan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kawan yang sudah matang gonad dengan ukuran panjang 8-10 cm sejumlah 400 ekor. Lubang genital induk ikan dibersihkan menggunakan *tissue* untuk menghindari tercampurnya sperma dengan kotoran. Selanjutnya perut ikan di-*stripping* (diurut secara perlahan) ke arah lubang genital hingga keluar cairan berwarna putih (sperma). Semen tersebut ditampung dalam cawan petri yang ditempatkan dalam *ice box* bersuhu  $\pm 4$  °C.

Larutan pengencer semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 ml untuk setiap perlakuan. Untuk mencapai jumlah tersebut, 0,5 ml kuning telur dimasukkan ke dalam gelas ukur untuk menghasilkan persentase 5% dari total pengencer. Selanjutnya, ditambahkan DMSO sesuai konsentrasi yang diuji. Kemudian ditambahkan larutan Ringer hingga larutan mencapai 10 ml. Terakhir, ditambahkan 0,5 ml sperma untuk menghasilkan perbandingan sperma dengan pengencer sebesar 1 : 20 (Muchlisin *et al.*, 2004). Tabung yang berisi ekstender, krioprotektan dan sperma selanjutnya dimasukkan ke dalam masing-masing 3 *cryotube* volume 2 ml untuk menghasilkan 18 unit percobaan. Pengerjaan pada tahapan ini dilakukan dalam *ice box* bersuhu  $\pm 4$  °C. Semua *cryotube* yang berisi sperma dan pengencer diupak pada jarak 5 cm dari permukaan nitrogen cair selama 10 menit. Selanjutnya, *cryotube* tersebut dimasukkan ke dalam kontainer nitrogen cair bersuhu -196°C untuk disimpan selama 2 minggu. Setelah 2 minggu, *cryotube* yang berisi sperma beku diambil dari kontainer dan dicelupkan ke dalam air bersuhu 30-38°C selama 5 menit sampai sperma tersebut mencair. Uji fertilitas mengacu Muthmainnah *et al.* (2018) dengan cara mencampur 0,25 ml semen dengan 1 ml telur (perbandingan 1 : 4). Campuran sperma dengan telur tersebut kemudian diteteskan air (2 tetes) dan diaduk secara homogen dengan bulu ayam, didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya, 100 telur dipilih secara acak dan diinkubasi dalam aquarium pada suhu 26 °C.

### **Parameter**

Kualitas sperma diamati secara mikroskopis dan makroskopis. Parameter mikroskopis yang dilihat adalah warna, pH, konsistensi kekentalan, gerakan massa, motilitas sperma, dan analisa kerusakan DNA menggunakan metode elektroforesis gel. Sedangkan parameter makroskopis yang diuji adalah fertilitas dan penetasan telur.

### **Persentase motilitas sperma**

Penilaian motilitas dilakukan secara subyektif dengan pengamatan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran 400x. Sperma diamati selama 15 detik pasca aktivasi dengan mencampur satu tetes semen dengan dua tetes air di atas kaca preparat (Boonthai *et al.*, 2016).

### **Konsistensi dan derajat keasaman (pH) sperma**

Konsistensi semen ditentukan dengan mengacu kepada Ax *et al.* (2000). Sedangkan derajat keasaman (pH) dinilai dengan meneteskan semen ke atas kertas pH. Selanjutnya kertas pH yang sudah berubah warna dicocokkan dengan Test-kit indicator.

### **Elektroforesis**

Sebanyak 2 g agarosa ditimbang dan ditambahkan 100 ml larutan buffer TBE. Selanjutnya dipanaskan menggunakan microwave hingga bening dan mendidih. Kemudian ditambahkan 2 µl DNA dye dan dituang ke dalam cetakan gel yang telah disiapkan, dibiarkan selama 30 menit hingga dingin dan mengeras, kemudian gel siap digunakan. Selanjutnya, 1,5% gel agarosa dimasukkan ke dalam elektroforesis chambers. Ditambahkan larutan buffer 1x TBE ke dalam elektroforesis chambers hingga gel agarosa terendam. Campurkan sampel sebanyak 10 µl loading dye, disuntikkan ke dalam lubang sumur gel dengan disertakan 5 µl DNA marker. Kemudian, dielektroforesis dengan voltase 135 v selama 25 menit. Pembacaan hasil dilakukan dengan meletakkan gel agarosa di atas transilluminator uvidoc dengan membandingkan pita pada marker dan pita amplicon yang terbentuk.



**Pembuahan**

Tingkat pembuahan telur dihitung menggunakan rumus berikut (Viveiros *et al.*, 2010):

$$\text{Fertilization Rate (\%)} = \frac{\text{Jumlah telur yang dibuahi}}{\text{Jumlah total telur yang diinkubasi}} \times 100$$

**Penetasan**

Persentase daya tetas (HR) ditentukan berdasarkan rasio jumlah larva yang dihasilkan dengan jumlah telur yang diinkubasi (Viveiros *et al.*, 2010):

$$\text{Persentase penetasan telur(\%)} = \frac{\text{Jumlah telur yang menetas}}{\text{Jumlah total telur yang diinkubasi}} \times 100$$

**Analisis data**

Data yang ditampilkan berupa data deskriptif meliputi pH, warna, volume, konsistensi semen, dan kerusakan DNA. Sedangkan persentase motilitas, fertilitas dan penetasan telur dianalisa dengan ANOVA menggunakan SPSS versi 20.0. Nilai KK (Koefisien keragaman) pada penelitian ini > 10, sehingga dilakukan uji lanjut Duncan.

**Hasil**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sperma segar ikan kawan memiliki nilai motilitas sebesar 48,67%, pH 7, berwarna putih susu, dengan konsistensi sedang. Selanjutnya, penilaian gerakan massa menunjukkan hasil bahwa sperma tersebut berkualitas baik (++) (Arifiantini, 2012) yang ditandai dengan adanya gelombang tebal yang bergerak lamban (Tabel 1). Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa penambahan DMSO dalam pengencer berpengaruh nyata terhadap motilitas, fertilitas dan daya tetas telur ikan kawan (*Poropontius tawarensis*) (P<0,05) setelah pembekuan. Persentase motilitas sperma ikan kawan pada penelitian ini berkisar antara 12% hingga 48%, sedangkan persentase pembuahan yang dihasilkan berkisar antara 11% hingga 50%, dan angka penetasan telur berkisar antara 7% hingga 21% (Tabel 2).

Persentase motilitas sperma dan pembuahan telur ikan kawan tertinggi dijumpai pada penambahan DMSO dengan konsentrasi 6%, masing-masing sebesar 46,67% dan 45,67%. Nilai ini berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (P<0,05), namun tidak berbeda nyata dengan motilitas sperma segar (P>0,05). Persentase penetasan telur tertinggi juga dijumpai pada perlakuan 6% DMSO, dengan nilai 19,33%. Nilai ini tidak berbeda nyata dengan penetasan pada sperma segar, perlakuan 0%, 3%, dan 9% DMSO (P>0,05), namun berbeda nyata dengan perlakuan 12% dan 15% DMSO (P<0,05). Hasil uji integritas DNA menggunakan metode elektrofresis gel menunjukkan bahwa terdapat kerusakan pada DNA sperma ikan pasca pembekuan. Kerusakan pada DNA ditandai dengan munculnya pita *smear*. Perlakuan 0%, 3%, 6%, dan 15% DMSO menunjukkan adanya kerusakan DNA pada sperma, sedangkan perlakuan 9% dan 12% menunjukkan hanya sedikit kerusakan yang terjadi pada DNA sperma yang diamati (Gambar 1).

Tabel 1. Karakteristik semen segar ikan kawan (*Poropontius tawarensis*)

Parameter	Hasil
Warna	Putih susu
pH	7
Konsistensi	Sedang
Gerakan massa	++
Motilitas sperma segar	48,67 % ± 5,03

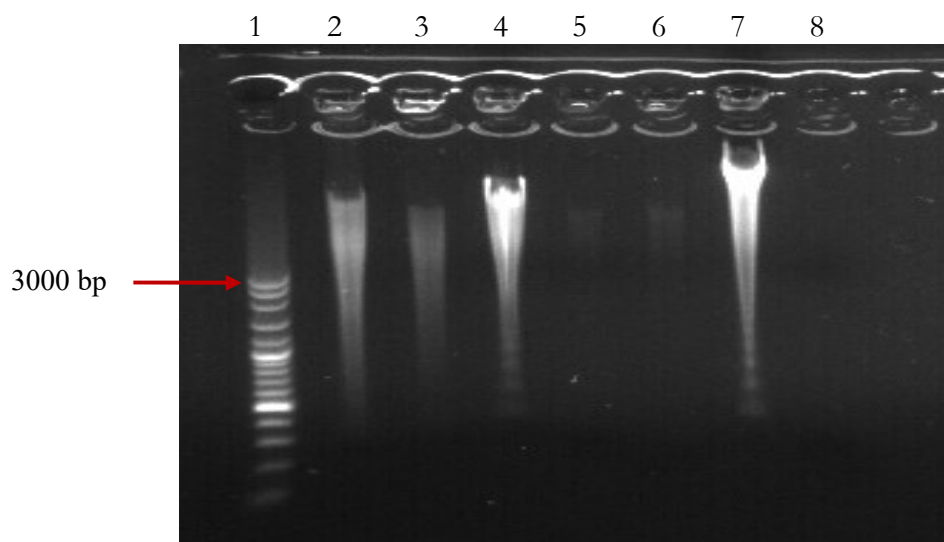
++: Terdapat gumpalan sperma yang tebal namun memiliki diameter yang relatif lebih kecil di beberapa bagian titik dan pergerakan sperma lebih lamban.



Tabel 2. Persentase motilitas, pembuahan dan penetasan telur ikan kawan (*Poropontius tawarensis*) pasca *thawing* dalam pengencer Ringer, 5% kuning telur, dan dengan penambahan berbagai konsentrasi DMSO.

Konsentrasi DMSO	Motilitas (%)	Pembuahan (%)	Penetasan telur (%)
Sperma segar	48,67 ± 5,03 <sup>c</sup>	50,33 ± 4,04 <sup>d</sup>	21,3 ± 6,65 <sup>b</sup>
0	31,33 ± 2,30 <sup>b</sup>	33,33 ± 6,11 <sup>c</sup>	10,33 ± 7,57 <sup>ab</sup>
3%	22,00 ± 3,46 <sup>ab</sup>	25,00 ± 7,00 <sup>bc</sup>	11,00 ± 4,35 <sup>ab</sup>
6%	46,67 ± 11,71 <sup>c</sup>	45,67 ± 7,23 <sup>d</sup>	19,33 ± 5,13 <sup>b</sup>
9%	18,66 ± 5,03 <sup>a</sup>	22,66 ± 2,51 <sup>b</sup>	10,33 ± 7,76 <sup>ab</sup>
12%	14,00 ± 4,00 <sup>a</sup>	17,33 ± 3,51 <sup>ab</sup>	7,67 ± 3,05 <sup>a</sup>
15%	12,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	11,33 ± 1,52 <sup>a</sup>	7,00 ± 3,60 <sup>a</sup>

Keterangan: Nilai rata-rata pada kolom yang sama dengan *superscript* yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



Gambar 4.1. Hasil elektroforesis sampel sperma ikan pasca pembekuan. Keterangan: Lajur 1 marker, lajur 2 (0% DMSO), lajur 3 (3% DMSO), lajur 4 (6% DMSO), lajur 5 (9% DMSO), lajur 6 (12% DMSO), lajur 7 (15% DMSO), lajur 8 (sperma segar).

## Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 6% DMSO dengan penambahan kuning telur sebesar 5% dapat melindungi sperma lebih baik dibanding dengan konsentrasi DMSO lainnya. Persentase motilitas dan fertilitas yang didapat pada konsentrasi tersebut adalah 46% dan 45%. Nilai ini tidak berbeda nyata dengan motilitas sperma segar. Selanjutnya, persentase motilitas tertinggi diikuti oleh DMSO 0% dan 3%. Tingginya motilitas dan fertilitas pada penambahan 6% DMSO dibanding pada perlakuan lain diduga terjadi karena pada konsentrasi tersebut DMSO dapat bekerja optimum untuk melindungi sperma. Hasil tersebut menunjukkan bahwa motilitas dan pembuahan menurun pada konsentrasi DMSO diatas 6%. Persentase DMSO yang tinggi diduga dapat menyebabkan tingginya toksisitas DMSO terhadap sel (Muchlisin *et al.*, 2009). Konsentrasi DMSO yang terlalu rendah juga dapat menyebabkan rendahnya motilitas sperma. Hal ini diduga terjadi karena semakin rendah konsentrasi DMSO, semakin rendah pula kemampuan perlindungan DMSO terhadap sperma. DMSO bekerja dengan cara masuk kedalam sel dan menggantikan air dalam sel sehingga elektrolit-elektrolit intraselular keluar



(Shahverdi *et al.*, 2018). DMSO masuk ke dalam sel sampai pada titik konsentrasi yang tidak berbahaya selama pembekuan. Proteksi krioprotektan terhadap membran sel merupakan indikasi dari interaksi yang berjalan baik antara krioprotektan dan membran sel. Interaksi ini dapat mengurangi kerusakan membran sel pada saat terjadi perubahan keadaan dari relatif cair ke struktur relatif padat dan juga pada saat kembali ke struktur yang relatif cair selama proses pencairan atau *thawing* (Kostaman, 2011).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa persentasi pembuahan telur berbanding lurus dengan motilitas sperma. Semakin tinggi motilitas, semakin tinggi pula telur yang dibuahi, dan begitu pula sebaliknya. Hal ini seiring dengan pendapat Ardias (2008) yang menyatakan bahwa keberhasilan pembuahan sangat bergantung pada kualitas sperma dan kondisi telur. Salah satu parameter kualitas sperma adalah nilai motilitasnya. Woynarovich dan Horvath (1980) menyatakan bahwa saat sel telur berada dalam air, air akan masuk diantara cangkang dan inti, sehingga ruang perivitelin akan mengembang dan mikrofil akan menutup dalam waktu satu menit sehingga tidak ada sperma yang dapat masuk. Hal ini dapat menyebabkan sel telur tidak terbuahi. Iromo *et al.* (2007) juga menjelaskan bahwa tingginya fertilitas berhubungan dengan komposisi pengencer yang mampu memberikan sumber energi dan perlindungan pada spermatozoa. Dalam penelitian ini, pengencer yang digunakan adalah larutan Ringer. Ringer mengandung NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> dan NaHCO<sub>3</sub>.

Persentase telur ikan kawan yang menetas tertinggi terdapat pada perlakuan 6% DMSO, yaitu sebesar 19%. Selanjutnya diikuti dengan perlakuan 3%; 0%; 9%; 12% dan 15% dengan nilai masing-masing 11%; 10,3%; 7,67%; dan 7%. Secara umum terlihat angka penetasan ikan kawan tergolong rendah, hal ini mungkin disebabkan karena selama penetasan telur-telur terserang jamur mengakibatkan banyak telur yang mati dan tidak menetas. Hasil temuan ini menunjukkan bahwa perlu dilakukan penanganan pada air yang akan digunakan sebagai media penetasan. Salah satu penanganan air yang dapat dilakukan adalah dengan menambahkan desinfektan ke dalam air sebelum telur diinkubasi.

Daya tetas telur dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kualitas telur, kualitas sperma yang membuahi, serta kualitas air dalam wadah penetasan. Kualitas telur yang baik dicirikan dengan warna putih bening dan berbentuk bulat atau bulat lonjong. Sedangkan sperma yang baik adalah sperma yang tidak cacat, bergerak aktif, dan mampu membuahi telur (Islam *et al.*, 2011). Kualitas air seperti pH (Gao, 2011); DO, dan suhu (Wijayanti, 2010) sangat berperan penting, sebab perubahan kualitas air yang terjadi secara mendadak dapat menyebabkan kematian pada telur. Selama penelitian, penanganan telur dilakukan dalam aquarium terkontrol. Kondisi kualitas air disesuaikan dengan kebutuhan hidup telur ikan kawan. Hasil pengukuran kualitas air menunjukkan bahwa nilai pH berkisar antara 6 hingga 7,3; oksigen terlarut dalam air (DO) berkisar 4 hingga 5 ppm; dan suhu air berkisar antara 26<sup>o</sup> C hingga 28<sup>o</sup> C.

Hasil elektroforesis pada sperma pasca pembekuan yang ditunjukkan pada Lajur 2 (Gambar 2) adalah sampel sperma yang tidak ditambahkan DMSO. Hasil *smear* pada lajur tersebut menunjukkan bahwa terdapat fragmentasi pada DNA. Hal ini diduga terjadi karena pemberian kuning telur belum cukup mampu mempertahankan integritas DNA sperma. Selanjutnya, pita *smear* pada lajur 3 menunjukkan hasil yang lebih baik dibanding lajur 2. Hal ini mungkin disebabkan penambahan kuning telur dan 3% DMSO mampu mempertahankan integritas DNA lebih baik dibanding tanpa penambahan DMSO.

Pita *smear* pada lajur 4 (6% DMSO) menunjukkan adanya kerusakan DNA yang terjadi pada sperma ikan. Lajur 5 dan 6 (9% dan 12% DMSO) menunjukkan pita *smear* yang lebih tipis dan lebih pendek dibanding perlakuan lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua dosis tersebut mampu mempertahankan integritas DNA sperma selama proses pembekuan. Pita *smear* pada lajur 7 (15% DMSO) menunjukkan bahwa terjadi kerusakan pada sampel yang diamati. Kerusakan ini mungkin diakibatkan dosis DMSO yang ditambahkan ke dalam pengencer terlalu tinggi. Dosis yang terlalu tinggi dapat merubah fungsi krioprotektan sebagai



pelindung menjadi toksik. Akibatnya, DNA sperma mengalami fragmentasi. Lajur 8 menunjukkan hasil elektroforesis sperma segar. Tidak ada pita *smear* yang terlihat pada lajur ini.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa penambahan 9% dan 12% DMSO memberikan hasil yang lebih baik bagi sperma dibanding dosis 6% DMSO, berbanding terbalik dengan nilai motilitas, pembuahan dan penetasan. Fragmentasi DNA pada dosis 6% DMSO dalam penelitian ini diduga tidak hanya diakibatkan oleh krioprotektan, namun juga dipengaruhi oleh proses pembekuan dan pencairan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Labbe *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa krioprotektan merupakan penyebab minor terjadinya kerusakan DNA. Penyebab yang lebih besar adalah karena proses pembekuan dan pencairan. Cabrita *et al.* (2005) menyatakan bahwa proses pembekuan dan pencairan dapat merusak sperma lebih parah dibanding toksisitas krioprotektan. Cabrita menyatakan bahwa ada beberapa penyebab rusaknya DNA sperma: pertama, konsentrasi kalsium yang meningkat dalam sel pada saat kriopreservasi dapat merangsang aktivasi endonuklease sehingga terjadi kerusakan DNA; kedua, proses kriopreservasi menyebabkan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) yang akan meningkatkan peroksidasi dan menyebabkan fragmentasi DNA; ketiga, rusaknya pita DNA juga dapat diakibatkan oleh komponen genotoxic.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kerusakan DNA tidak terlalu mempengaruhi motilitas, fertilitas, dan penetasan. Sperma yang terfragmentasi masih mampu bergerak sehingga nilai motilitasnya yang dapat dipertahankan. Selanjutnya, penelitian ini juga menunjukkan bahwa fertilitas dipengaruhi oleh motilitas, bukan fragmentasi DNA. Semakin tinggi motilitas, semakin tinggi pula fertilitas. Yusoff *et al.* (2018) juga menyatakan bahwa DNA tidak bisa dijadikan sebagai tolak ukur dalam menentukan motilitas dan pembuahan sebab sperma yang mengalami fragmentasi DNA masih dapat memiliki nilai motilitas dan menghasilkan fertilitas yang tinggi. Cabrita *et al.* (2005) menyatakan bahwa pembuahan dan penetasan tidak hanya dipengaruhi oleh sperma, namun juga dapat dipengaruhi oleh oosit. Oosit yang baik berpotensi menghasilkan embrio yang baik. Embrio akan berkembang sehingga tingkat pembuahan dan penetasannya pun tinggi. Sebaliknya, oosit yang berkualitas buruk menyebabkan perkembangan embrio terganggu, sehingga tingkat penetasannya pun rendah.

### **Kesimpulan**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi DMSO optimum untuk kriopreservasi sperma ikan kawan adalah 6% DMSO. Konsentrasi ini menghasilkan nilai motilitas, pembuahan, dan penetasan telur masing-masing sebesar 46%, 45%, dan 19%. Integritas DNA terbaik ditunjukkan pada penambahan 9% dan 12% DMSO.

### **Ucapan Terimakasih**

Penelitian ini didanai melalui Skim Professor 2018 (Kontrak No:287/UN11/DSP/PNBP/2018 Universitas Syiah Kuala. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada Universitas Syiah Kuala yang telah mendanai penelitian ini serta kepada semua pihak yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam penelitian ini.

### **Daftar Pustaka**

- Adriansyah. 1988. Studi beberapa aspek biologi ikan kawan (*Poropuntius tawarensis*) yang tertangkap dengan gillnets (doran kawan) di Danau Laut Tawar Kabupaten Aceh Tengah Provinsi Daerah Istimewa Aceh. Skripsi, Departmen Manajemen Sumberdaya Perairan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Arifiantini, R.I. 2012. Teknik koleksi dan evakuasi semen pada hewan. Institut Pertanian Bogor Press, Bogor.
- Ax, R.L., M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, M.E. Bellin. 2000. Semen evaluation. In: B. Hafez, E.S.E Hafez (Ed.), *Reproduction in Farm Animals*.



- Wiley Online Library, pp. 363-375.
- Beirão, J., E. Cabrita, S. Pérez-Cerezales, S. Martínez-Páramo, M.P. Herráez. 2011. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology*, 62(1): 22-31.
- Boonthai, T., W. Khaopong, J. Sangsong, T. Sooksawat, S. Nimrat, V. Vuthiphandchai. 2016. Semen collection methods affect the bacterial composition of post-thawed semen of silver barb (*Barbodes gonionotus*). *Animal Reproduction Science*, 166: 90–98.
- Cabrera, E., V. Robles, L. Rebordinos, C. Sarasquete, M.P. Heeraez. 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50(2): 144-153.
- Chao, N., C. Liao. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197(1-4): 161-189.
- Dziewulska, K., A. Rzemieniecki, R. Czerniawski, J. Domagała. 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, 76(2): 300-311.
- Gao, Y., K. Sun-Gyu, L. Jeong-Yeol. 2011. Effects of pH on fertilization and the hatching rates of far eastern catfish *Silurus asotus*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(4): 417-420.
- Iromo, H., Supriatna, I., Riani, E. 2007. Efektivitas pengencer laktat ringer, modifikasi ringer dan larutan fisiologis NaCl terhadap viabilitas preservasi spermatozoa ikan baung (*Mystus nemurus*). *Aquacultura Indonesia*, 8(1): 49 – 57.
- Islam, M. S., T. Akhter. 2011. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: A Review. *Journal Adv Life Science*, 1(1): 11-19.
- Jodun, W. A., K. King, P. Farrell. 2007. Methanol and egg yolk as cryoprotectants for Atlantic salmon spermatozoa. *North American Journal of Aquaculture*, 69(1): 36-40.
- Junior, M. Z., S. Handayani, I. Supriatna. 2005. Kualitas sperma ikan batak (*Tor soro*) hasil kriopreservasi semen menggunakan Dimetilsulfoksida (DMSO) dan Gliserol 5, 10 dan 15%. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 4(2): 145-151.
- Khan, N. S., R.I. Sarder, M.A. Al- Faroque, M.F. Mollah. 2015. Standardization of sperm cryopreservation techniques of Indian Major Carp Rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(6): 175-181.
- Kostaman, T., A.R. Setioko. 2011. Perkembangan penelitian teknik kriopreservasi untuk penyimpanan semen unggas. *Wartazoa*, 21(3): 145-152.
- Martínez, G., G.V. Atencio, C.S. Pardo. 2011. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Revista MVZ Córdoba*, 16, 2554-2563.
- Muchlisin, Z. A., M. Musman, M.N. Siti Azizah. 2010. Length-weight relationships and condition factors of two threatened fishes, *Rasbora tawarensis* and *Poropuntius tawarensis*, endemic to Lake Laut Tawar, Aceh Province, Indonesia. *Journal Applied Ichthyology*, 26: 949–953.
- Muchlisin, Z. A., N. Fadli, E. Rudi, T. Mendo, M. N. Siti-Azizah. 2011. Estimation of production trend of the depik, (Teleostei, Cyprinidae), in Lake Laut Tawar, Indonesia. *AACL Bioflux*, 4(5): 590-597.
- Muchlisin, Z.A. 2008. Ikan depik yang terancam punah. *Buletin Leuser*, 6(17): 9-12
- Muchlisin, Z.A., M.N. Siti-Azizah. 2009. Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. *Cryobiology*, 58(2): 166-169.
- Muchlisin, Z.A., F. Rinaldi, N. Fadli, M. Adlim, M.N. Siti-Azizah. 2015. Food preference and diet overlap of two endemic and threatened freshwater fishes, depik (*Rasbora tawarensis*) and kawan (*Poropuntius tawarensis*) in Lake Laut Tawar, Indonesia. *AACL Bioflux*, 8(1): 40-49.
- Muchlisin, Z.A., R. Hashim, A. Chong. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of





- bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa: Effect of different extenders and cryoprotectants on the motility after short-term storage. *Theriogenology*, 62(1-2): 25-37.
- Muchlisin, Z.A., I. Hasri. 2015. Karakteristik biologi ikan dominan Danau Laut Tawar. In: *Pengelolaan sumberdaya perikanan Danau Laut Tawar Aceh Tengah* (N.N. Widnyana, M.M. Kamal eds.). Amfrad Press, Jakarta. pp. 252-281.
- Muchlisin, Z.A., Z. Thomy, N. Fadli, M.A. Sarong, M.N. Siti-Azizah. 2013. DNA barcoding of freshwater fishes from Lake Laut Tawar, Aceh Province, Indonesia. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 43(1): 21-29.
- Muthmainnah, C.R., K. Eriani, I. Hasri, M. Irham, A.S. Batubara, Z.A. Muchlisin. 2018. Effect of glutathione on sperm quality after short-term cryopreservation in seurukan fish *Osteochilus vittatus* (Cyprinidae). *Theriogenology*, 122: 30-34.
- Sarder, M. R. I., A.K.M.A. Rahman, M.S. Samad, K.M.S. Nazrul, M.K.J. Bhuiyan. 2011. Cryopreservation of sperm of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) and its use in fertilization and hatching of eggs. *Progressive Agriculture*, 22(1-2): 123-137.
- Shahverdi, A., M. Hezavehei, M. Sharafi, H.M. Kouchesfahani, R. Henkel, A. Agarwal, V. Esmaeili. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches – A review. *Reproductive BioMedicine Onlajur*, 37(3): 327-338.
- Viveiros, A.T.M., A.F. Nascimento, L.H. Orfão, Z.A. Isaú. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lajuratus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74: 551-556.
- Wargasasmita. 2002. Ikan air tawar endemik Sumatera yang terancam punah. *Jurnal Ikhtiologi Indonesia*, 2 (2): 41-49.
- Wijayanti, G. E., P. Sugiarto, A. Susatyo, Nuryanto. 2010. Perkembangan embrio dan larva ikan nilam yang diinkubasi pada media dengan berbagai temperatur. *Prosiding Semnas Basic Science VII*, 3, 180-187.
- Woynarovich, E., L. Horvarth. 1980. The artificial propagation of warm-water fin fish. A manual for extention. *FAO Fish Technology*, 201: 183 p.
- Yusoff, M., B.N. Hassan, M. Ikhwanuddin, S.M. Sheriff, F. Hashim, S. Mustafa, I.C.C. Koh. 2018. Successful sperm cryopreservation of the brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* using propylene glycol as cryoprotectant. *Cryobiology*, 81: 168-173.

*How to cite this paper:*

Muthmainnah, C.R., , K. Eriani, I. Hasri, Nur Fadli, A.A. Muhammadar, Z.A. Muchlisin 2019. Kriopreservasi sperma ikan kawan *Poropontius tawarensis* menggunakan Dimetil sulfoxida (DMSO). *Depik Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir dan Perikanan*, 8(3): 158-166