

Pembekuan semen lele dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) sebagai model kriopreservasi semen ikan

[Freezing of african catfish semen (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) as a model of cryopreservation fish semen]

Lutfi^{1,✉}, R. I. Arifiantini², B. Purwantara²

¹Jurusan Perikanan FPPK Universitas Negeri Papua

²Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi FKH Institut Pertanian Bogor

✉Jurusan Perikanan FPPK Universitas Negeri Papua

Jln. Gunung Salju Amban Manokwari-Papua Barat 98314

e-mail: kissbam_lut@yahoo.com

Diterima: 26 Februari 2011; Disetujui: 13 Desember 2011

Abstrak

Efek empat jenis pengencer dan empat konsentrasi dimetil sulfoksida (DMSO) (5%, 10%, 15% dan 20%) dari motilitas spermatozoa ikan lele dumbo dievaluasi setelah penyimpanan pada suhu beku. Upaya kriopreservasi semen lele dumbo terhadap 16 kombinasi perlakuan yang terdiri atas beberapa tahap, yaitu: persiapan pengenceran semen lele dumbo; pencampuran dengan bahan pengencer DMSO; pengepakan semen di dalam *straw* 0,3 ml; equilibrasi pada suhu lemari es pada suhu 4°C selama 30 menit; semen lele dumbo dibekukan di atas uap nitrogen cair dengan tinggi 6,5 cm selama 10 menit dan selanjutnya disimpan dalam wadah nitrogen cair (-196°C) untuk dianalisis lanjut guna melihat *post-thawing motility* (PTM). Hasil analisis PTM, terhadap tingkat motilitas spermatozoa lele dumbo, terlihat bahwa nilai tertinggi pada perlakuan P₁D₁₅ (45,7±4,3%) dan terendah pada perlakuan P₂D₂₀ (14,5±13,2%). Pengencer terbaik adalah pengencer yang mengandung NaCl, KCl, CaCl₂, dan NaHCO₃. Konsentrasi terbaik DMSO adalah konsentrasi DMSO 15%. Sementara interaksi terbaik antara pengencer dengan konsentrasi DMSO adalah P₁D₁₅ perlakuan yang mengandung NaCl, KCl, CaCl₂, dan NaHCO₃ dengan kombinasi konsentrasi DMSO 15%. Kesimpulan, upaya kriopreservasi sperma lele dumbo dapat menggunakan pengencer yang mengandung NaCl, KCl, CaCl₂, dan NaHCO₃ dengan kombinasi konsentrasi DMSO 15%.

Kata penting: *Clarias gariepinus*, kriopreservasi, pengencer, dimetil sulfoksida, semen.

Abstract

Effect of four types of diluents and four concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) (5%, 10%, 15% and 20%) of African catfish spermatozoa motility were evaluated after storage at freezing temperatures. Efforts African catfish semen cryopreservation in 16-thinning treatment combinations consisting of several stages, namely: preparation of dilution, mixing with DMSO diluents, packing semen in 0.3 mL straw, equilibrasi semen at a temperature of the refrigerator at 4°C for 30 minutes, freezing semen in nitrogen vapor liquid with a height of 6.5 cm for 10 min and subsequent storage of semen in the container of liquid nitrogen (-196°C) for further analyzed post-thawing motility (PTM). Results of analysis PTM, seen the level of sperm motility was shown at P₁D₁₅ treatment (45.7 ± 4.3%) and the lowest in P₂D₂₀ treatment (14.5 ± 13.2%). The best diluent on this observation is a diluent containing NaCl, KCl, CaCl₂ and NaHCO₃. The best concentration of DMSO is 15% DMSO concentration. While the best interaction between the diluent with the concentration of DMSO is P₁D₁₅ treatments containing NaCl, KCl, CaCl₂ and NaHCO₃ with a combination of 15% DMSO concentration. Conclusion, making efforts to cryopreservation of African catfish semen can use a diluent containing NaCl, KCl, CaCl₂ and NaHCO₃ with a combination of 15% DMSO concentration.

Keywords: *Clarias gariepinus*, cryopreservation, diluent, dimethyl sulfoxide, semen.

PENDAHULUAN

Lele dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) merupakan salah satu jenis ikan konsumsi air tawar dengan bentuk tubuh yang memanjang dan kulit yang licin. Lele dumbo merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki daging yang cukup lezat, mudah dicerna dan memi-

liki gizi yang tinggi. Selain itu, lele dumbo dapat tumbuh dengan cepat dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi pada lapisan masyarakat Indonesia. Menurut Pusat Data Statistik dan Informasi (2006), jumlah benih lele dumbo yang ditebar di seluruh Indonesia baik di kolam, sawah dan keramba pada tahun 1999 sebanyak 1.780.900

benih yang semakin meningkat pada tahun 2004 sebanyak 18.651.983 benih, dan diperkirakan kebutuhan benih lele akan semakin meningkat.

Kegiatan pemijahan lele dumbo secara alamiah masih menghadapi kendala seperti masalah musim pemijahan yang berbeda antara jantan dan betina. Secara buatan fertilisasi dapat dilakukan, tetapi pada lele dumbo jantan koleksi semen tidak dapat dilakukan dengan teknik *stripping* seperti pada ikan jantan spesies lain. Oleh karena itu untuk melakukan koleksi semen pada lele dumbo harus mengorbankan induk jantan, padahal jumlah semen yang diperoleh sangat banyak sehingga dibutuhkan teknik kriopreservasi untuk pengawetan bibit semen agar dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama.

Upaya kriopreservasi semen ikan telah banyak dilaporkan. Diantaranya oleh Kurokura *et al.* (1984) yang melakukan kriopreservasi ikan mas di dalam medium yang mengandung NaCl, KCl, CaCl₂, dan NaHCO₃. Horvath & Urbanyi (2000) telah melakukan kriopreservasi semen lele dumbo menggunakan pengencer kombinasi fruktosa dan dimetil sulfoksida (DMSO). Penggunaan krioprotektan DMSO untuk kriopreservasi semen ikan telah dilaporkan oleh Warnecke & Pluta (2003), pada lele dumbo menggunakan pengencer fruktosa dikombinasikan dengan NaHCO₃-CO₂ dengan konsentrasi DMSO 10% menghasilkan motilitas spermatozoa pasca *thawing* 25%. Pada ikan patin, Kwantong & Bart (2003) menggunakan NaCl dan DMSO 12% dengan fertilitas sebesar 40,8%. Akcay *et al.* (2004), melaporkan pengencer yang mengandung NaCl, KCl, CaCl₂ dan NaHCO₃ dengan DMSO 15% pada ikan mas kaca menunjukkan motilitas pasca *thawing* yang tertinggi sebesar 55%. Dari paparan tersebut terlihat bahwa jenis pengencer dan konsentrasi DMSO yang digunakan berbeda-beda. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan

untuk mencari satu jenis pengencer terbaik dan menentukan konsentrasi DMSO yang tepat dalam berbagai pengencer semen lele dumbo.

Bahan dan metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2008 sampai dengan Juni 2009 di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Induk ikan yang digunakan pada penelitian ini adalah induk jantan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) sebanyak 20 ekor dengan bobot tubuh 1,0-2,0 kg ekor⁻¹ dan 5 ekor induk lele dumbo betina untuk uji fertilitas dengan bobot 1,0-1,5 kg ekor⁻¹ diperoleh dari petani pembudidaya lele dumbo di sekitar Bogor dan Parung. Induk jantan dan betina lele dumbo yang telah matang gonad dipelihara terpisah pada wadah bak plastik yang dilengkapi dengan aerator air.

Penyiapan bahan pengencer dilakukan secara dua tahap. Yang pertama penyiapan pengencer dasar sebanyak empat macam dengan komposisi seperti yang terlihat pada Tabel 1. Tahap kedua, penyiapan pengencer untuk spermatozoa beku yang terdiri atas kombinasi yaitu 16 kombinasi pengencer (4 pengencer x 4 konsentrasi DMSO), seperti yang terlihat pada Tabel 2. Selanjutnya komposisi bahan pengencer semen beku disajikan pada Tabel 3.

Spermatozoa diolah secara individual dan hanya spermatozoa yang menunjukkan persentase spermatozoa motil >60% digunakan dalam penelitian ini (Warnecke & Pluta, 2003). Spermatozoa yang telah diencerkan sesuai perlakuan dengan konsentrasi 100x10⁶ spermatozoa ml⁻¹. Persentase motilitas spermatozoa lele dumbo dilihat di bawah mikroskop dengan memberikan larutan pembuahnya. Larutan pembuahan yang digunakan untuk spermatozoa lele dumbo berupa

akuades, lalu dikemas ke dalam *straw* minitub (0,3 ml), dan selanjutnya *straw* diequilibrasi dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 30 menit (Warnecke & Pluta, 2003). Pembekuan di atas permukaan nitrogen (N₂) cair dengan jarak 6,5 cm selama 10 menit. Semen beku disimpan

di dalam kontainer (N₂) cair suhu -196 °C untuk dilakukan evaluasi lebih lanjut.

Semen beku di-*thawing* pada air hangat (30 °C) selama 30 detik. Pengamatan persentase motilitas spermatozoa progresif dinilai secara subyektif kuantitatif dari lima lapangan pandang yang berbeda.

Tabel 1. Komposisi larutan pengencer dasar lele dumbo

Bahan	Jenis pengencer (P)			
	1	2	3	4
NaCl (g)	0,75	0,3	0,88	-
KCl (g)	0,02	-	1,12	-
CaCl ₂ (g)	0,02	-	-	-
NaHCO ₃ (g)	0,02	0,05	-	-
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (g)	-	-	0,36	-
Glukosa (g)	-	6,0	-	-
Fruktosa (g)	-	-	-	6,0
Aquades (ml)	100	100	150	100

Ket.: P₁ Kurokura *et al.* (1984), P₂ Zhang dan Liu (1991), P₃ Cognie *et al.* (1989), dan P₄ Horvath & Urbanyi (2000)

Tabel 2. Perlakuan komposisi bahan pengencer lele dumbo (*C. gariepinus*) konsentrasi DMSO secara bertingkat

Pengencer	DMSO (%)			
	5	10	15	20
P ₁	P ₁ D ₅	P ₁ D ₁₀	P ₁ D ₁₅	P ₁ D ₂₀
P ₂	P ₂ D ₅	P ₂ D ₁₀	P ₂ D ₁₅	P ₂ D ₂₀
P ₃	P ₃ D ₅	P ₃ D ₁₀	P ₃ D ₁₅	P ₃ D ₂₀
P ₄	P ₄ D ₅	P ₄ D ₁₀	P ₄ D ₁₅	P ₄ D ₂₀

Tabel 3. Komposisi bahan pengencer semen beku

Perlakuan	Pengencer dasar (ml)	DMSO (ml)	Jumlah (ml)
P ₁ D ₅	9,5	0,5	10,0
P ₁ D ₁₀	9,0	1,0	10,0
P ₁ D ₁₅	8,5	1,5	10,0
P ₁ D ₂₀	8,0	2,0	10,0
P ₂ D ₅	9,5	0,5	10,0
P ₂ D ₁₀	9,0	1,0	10,0
P ₂ D ₁₅	8,5	1,5	10,0
P ₂ D ₂₀	8,0	2,0	10,0
P ₃ D ₅	9,5	0,5	10,0
P ₃ D ₁₀	9,0	1,0	10,0
P ₃ D ₁₅	8,5	1,5	10,0
P ₃ D ₂₀	8,0	2,0	10,0
P ₄ D ₅	9,5	0,5	10,0
P ₄ D ₁₀	9,0	1,0	10,0
P ₄ D ₁₅	8,5	1,5	10,0
P ₄ D ₂₀	8,0	2,0	10,0

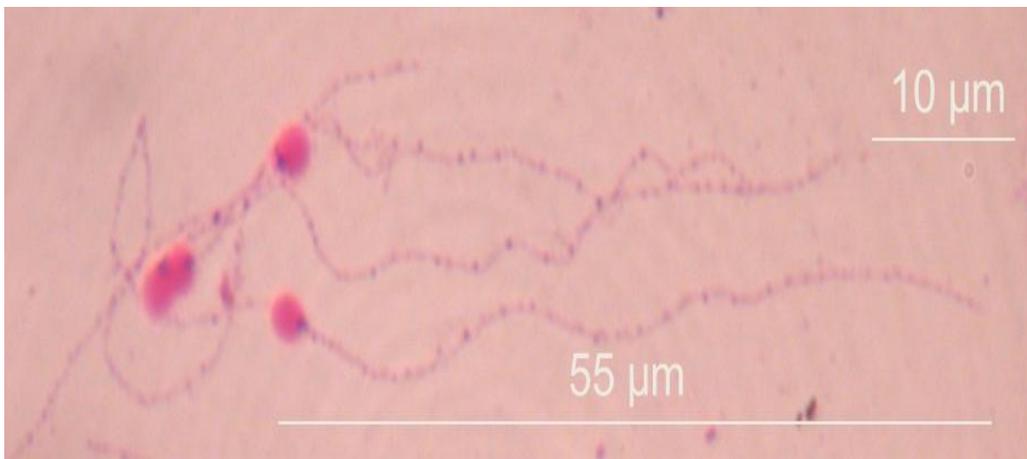
Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan faktorial RAK dua faktorial dengan pola faktorial 4x4 (empat jenis pengencer dan empat konsentrasi DMSO) dengan ulangan tujuh kali. Data dianalisis menggunakan uji sidik ragam (ANOVA) searah dengan *SPSS for windows* (Ver.11) dan jika ada perbedaan dilanjutkan uji Duncan.

Hasil

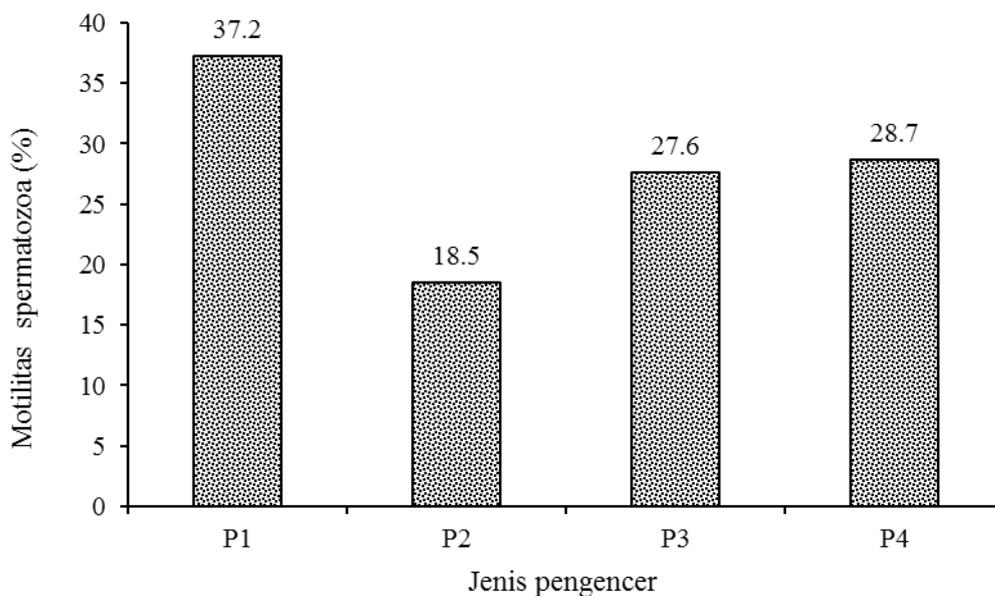
Morfologi spermatozoa lele dumbo yang diamati di bawah mikroskop pembesaran 40 de-

ngan menggunakan pewarnaan Williams, terlihat bahwa bentuk spermatozoa lele dumbo memiliki panjang ekor yang sangat panjang ($\pm 55 \mu\text{m}$) dan tipis sekali (Gambar 1).

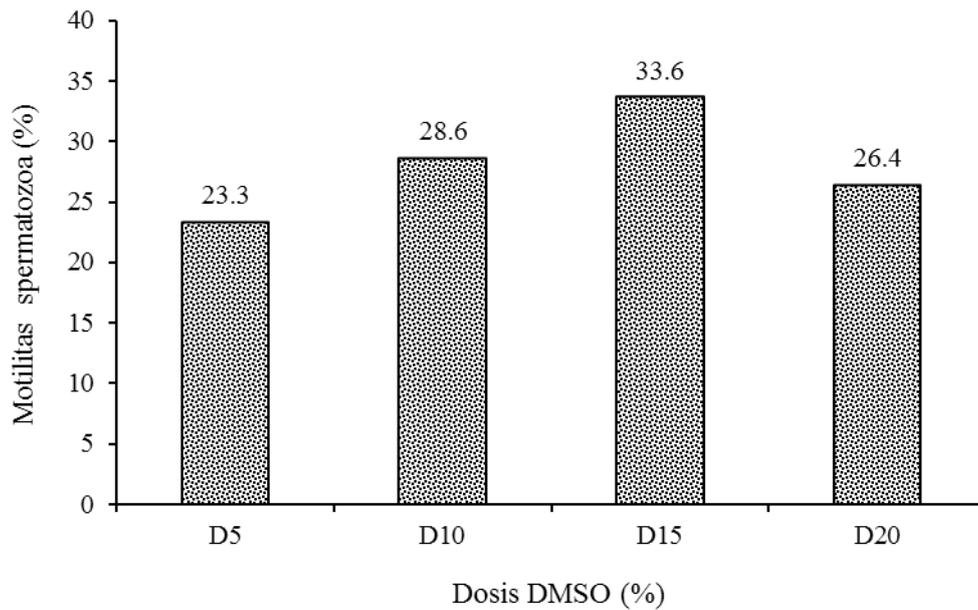
Hasil yang diperoleh selama penelitian berlangsung mengenai pengaruh jenis pengencer yang digunakan terhadap kualitas semen beku lele dumbo terlihat bahwa pengencer P₁ menunjukkan persentase motilitas tertinggi dibandingkan ketiga pengencer lainnya (Gambar 2).



Gambar 1. Morfologi spermatozoa lele dumbo menggunakan pewarnaan Williams



Gambar 2. Motilitas spermatozoa pasca *thawing* lele dumbo pada berbagai bahan pengencer



Gambar 3. Motilitas spermatozoa pasca *thawing* lele dumbo pada berbagai konsentrasi DMSO

Tabel 4. Rataan persentase kualitas semen beku lele dumbo pada beberapa jenis pengencer dan konsentrasi DMSO

Pengencer	Dosis DMSO (%)	Kode	Motilitas spermatozoa (%)
1	5	P ₁ D ₅	31,7±7,1 ^{bc}
	10	P ₁ D ₁₀	37,4±4,8 ^b
	15	P ₁ D ₁₅	45,7±4,3 ^a
	20	P ₁ D ₂₀	34,1±6,4 ^b
2	5	P ₂ D ₅	20,0±11,0 ^{efg}
	10	P ₂ D ₁₀	18,8±11,5 ^{fg}
	15	P ₂ D ₁₅	20,5±9,9 ^{efg}
	20	P ₂ D ₂₀	14,5±13,2 ^g
3	5	P ₃ D ₅	17,1±8,3 ^g
	10	P ₃ D ₁₀	26,9±8,6 ^{cd}
	15	P ₃ D ₁₅	34,5±5,3 ^b
	20	P ₃ D ₂₀	31,7±7,0 ^{bc}
4	5	P ₄ D ₅	24,3±9,4 ^{def}
	10	P ₄ D ₁₀	31,4±8,6 ^{bc}
	15	P ₄ D ₁₅	33,8±8,8 ^b
	20	P ₄ D ₂₀	25,2±13,9 ^{de}

Ket.: Huruf berbeda yang mengikuti angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Pengaruh konsentrasi DMSO yang diberikan terhadap kualitas semen beku lele dumbo yang diamati selama penelitian berlangsung, terlihat bahwa penggunaan konsentrasi DMSO sebanyak 15% memberikan persentase motilitas tertinggi dibandingkan ketiga konsentrasi DMSO lainnya (Gambar 3).

Hasil yang diperoleh selama penelitian berlangsung mengenai pengaruh interaksi jenis pengencer dan konsentrasi DMSO yang digunakan terhadap kualitas semen beku lele dumbo. Perlakuan P₁D₁₅ (45,7±4,3) menunjukkan nilai persentase motilitas spermatozoa lele dumbo tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya dan persen-

tase terendah diperoleh pada perlakuan P₂D₂₀ (14,5±13,2) (Tabel 4).

Pembahasan

Berdasarkan hasil yang diperoleh terlihat bahwa morfologi spermatozoa lele dumbo berbeda dengan spermatozoa mamalia. Bentuk kepala lebih bulat dengan ekor yang tipis dan panjang. Dengan menggunakan pewarnaan Williams panjang total dari kepala sampai dengan ujung ekor ±55 µm.

Pengaruh jenis pengencer terhadap kualitas semen beku lele dumbo

Keempat pengencer yang digunakan (tanpa memperhitungkan konsentrasi DMSO) pengencer P₁ (37,2±5,6) menunjukkan persentase motilitas secara nyata (P<0,05) tertinggi dibandingkan dengan ketiga pengencer lainnya, seperti terlihat pada Gambar 2. Pengencer terbaik berikutnya adalah P₄ (28,7±10,1%) dan P₃ (27,6±7,3%) dan tidak ada perbedaan yang nyata di antaranya. Motilitas P₂ menunjukkan yang paling rendah yaitu 18,5±11,4%. Perbedaan kualitas tersebut kemungkinan disebabkan oleh komposisi kimia pada pengencer P₁ yang lebih lengkap, diantaranya terkandung NaCl, KCl, CaCl₂ dan NaHCO₃. Selain itu hasil pengukuran tekanan osmotik dari P₁ adalah 0,174 Osmol kg⁻¹ dan ternyata hampir sama dengan tekanan osmotik semen segar lele dumbo sebesar 0,170 Osmol kg⁻¹. Tiga pengencer lainnya menunjukkan tekanan osmotik yang lebih tinggi (hiperosmotik) yaitu P₄ (0,272 Osmol kg⁻¹) dan P₃ (0,323 Osmol kg⁻¹), sedangkan P₂ menunjukkan tekanan osmotik paling tinggi (0,375 Osmol kg⁻¹).

Pengaruh konsentrasi DMSO terhadap kualitas semen beku lele dumbo

Tanpa memperhitungkan jenis pengencer yang digunakan konsentrasi DMSO 15% (33,6±

7,0) menunjukkan persentase motilitas yang signifikan (P<0,05) lebih tinggi dibandingkan dengan ketiga konsentrasi DMSO lainnya, seperti terlihat pada Gambar 3. Konsentrasi DMSO 10% dan 20% menunjukkan persentase motilitas terbaik kedua dengan persentase motilitas masing-masing adalah 28,6±8,4% dan 26,4±10,1%, tidak ada perbedaan yang nyata di antaranya. Dosis DMSO 5% menunjukkan motilitas spermatozoa yang paling rendah yaitu 23,3±8,9%.

Konsentrasi DMSO 15% paling baik dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Hal ini kemungkinan konsentrasi tersebut yang paling baik dalam melindungi spermatozoa selama pembekuan. Konsentrasi DMSO 20% kemungkinan terlalu tinggi sehingga menyebabkan terjadinya toksisitas. Sebaliknya konsentrasi 5% dan 10% kemungkinan terlalu rendah sehingga tidak terlalu optimal dalam melindungi spermatozoa pada saat pembekuan. Konsentrasi 15% DMSO yang digunakan sama dengan yang dilaporkan oleh Akcay *et al.* (2004) bahwa dengan penggunaan DMSO 15% menghasilkan persentase motilitas spermatozoa *pascathawing* yang tertinggi sebesar 55% pada ikan mas kaca. Selanjutnya ditambahkan oleh Melo & Godinho (2006) bahwa penggunaan krioprotektan DMSO sebanyak 15% pada semen ikan *Brycon orthotaenia* menghasilkan motilitas *pascathawing* sebesar 83,3±19,1%.

Pengaruh interaksi jenis pengencer dan konsentrasi DMSO terhadap kualitas semen beku lele dumbo

Kualitas semen beku dinilai sebanyak tiga *straw* untuk setiap perlakuan. Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan diperoleh persentase motilitas semen beku lele dumbo tertinggi pada perlakuan P₁D₁₅ (45,7±4,3) dan persentase motilitas terendah diperoleh pada perlakuan

P₂D₂₀ (14,5±13,2) seperti yang terlihat pada Tabel 4.

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan terlihat bahwa dari uji statistik diketahui bahwa terdapat interaksi antara pengencer dengan konsentrasi memberikan pengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa lele dumbo. Hal ini disebabkan jenis pengencer yang digunakan memiliki komposisi bahan-bahan yang berbeda antar pengencer dan demikian pula untuk konsentrasi yang digunakan berbeda antar perlakuan. Menurut Warnecke *et al.* (2003), bahan pengencer yang mengandung NaHCO₃ paling sesuai untuk ditambahkan ke dalam pengencer semen beku lele dumbo yang memiliki kemampuan sistem *buffer* terhadap kondisi perubahan pH semen beku lele dumbo dibandingkan tris (*hydroxymethyl*) aminomethan. Konsentrasi juga memberikan pengaruh terhadap motilitas spermatozoa semen beku untuk melindungi sperma dari bahaya kerusakan pada saat kriopreservasi. Jadi dalam penggunaan bahan pengencer harus disesuaikan jenisnya dan konsentrasi yang akan digunakan untuk mendapatkan persentase motilitas spermatozoa pascathawing yang baik.

Dari seluruh rangkaian penelitian ini dapat dilakukan teknik kriopreservasi semen dengan menggunakan jenis pengencer P₁ yang memiliki komposisi NaCl, KCl, CaCl₂ dan NaHCO₃ dikombinasikan dengan krioprotektan DMSO sebanyak 15% pada semen beku lele dumbo.

Simpulan

Hasil yang dapat ditarik dari penelitian ini yaitu jenis pengencer yang terbaik adalah pengencer P₁ yang memiliki komposisi NaCl, KCl, CaCl₂ dan NaHCO₃ serta dosis krioprotektan DMSO yang terbaik adalah 15%, sedangkan je-

nis perlakuan yang terbaik adalah perlakuan P₁D₁₅.

Diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan mengenai pemeliharaan kualitas benih lele dumbo yang dihasilkan dengan menggunakan semen beku, guna keberhasilan peningkatan produksi benih lele dumbo.

Daftar pustaka

- Akcaý E, Yusuf B, Selcuk S, Necmettin T. 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28:837-843.
- Cognie F, Billard R, Chao NH. 1989. Freezing of the milt of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology*, 5:165-176.
- Horvath A & Urbanyi B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Research*, 31: 317-324.
- Kurokura H, Hirano R, Tomita M, Iwahashi M. 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37: 267-273.
- Kwantong S & Bart AN. 2003. Effect of cryoprotectants, extender and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. *Aquaculture Research*, 34:887-893.
- Melo FCSA & Godinho HP. 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction*, 3(3):380-385.
- Pusat Data Statistik dan Informasi. 2006. *Statistik kelautan dan perikanan tahun 2005*. Departemen Kelautan dan Perikanan. Sekretariat Jenderal Pusat Data, Statistik dan Informasi. Jakarta.
- Warnecke D & Pluta HJ. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl acetamide as the main cryoprotectants. *Aquaculture*, 215:1-4.
- Zhang X & Liu Y. 1991. Study of cryopreservation of fish spermatozoa. 1. Methods of freezing and thawing. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Normalis Hunanensis*, 15:59-63.