

Pengaruh larutan madu sebagai krioprotektan alami terhadap kualitas sperma ikan botia (*Chromobotia macracanthus* Bleeker 1852)

[The honey solution effect as a natural cryoprotectant on sperm quality of botia, *Chromobotia macracanthus* Bleeker 1852]

Abinawanto Abinawanto^{1,*}, Siti Z Musthofa², Retno Lestari¹, Anom Bowolaksono¹

¹ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Indonesia, Kampus Depok, Depok 16424

² Balai Riset Budidaya Ikan Hias, Depok,
abinawanto.ms@sci.ui.ac.id, siti.zuhriyyah@gmail.com, retno.lestari.budiman@gmail.com, alaksono@sci.ui.ac.id

Diterima: 28 Mei 2020; Disetujui: 01 September 2020

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi terbaik antara krioprotektan alami (larutan madu) dan krioprotektan sintetik (metanol) terhadap kualitas spermatozoa *Chromobotia macracanthus* Bleeker 1852, pasca penyimpanan pada suhu -80 °C selama 48 jam. Kombinasi metanol 10% dengan berbagai konsentrasi larutan madu (0%, 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7% dan 0,9%) diuji dalam penelitian ini. Larutan Ringer digunakan sebagai ekstender. Sperma yang telah diencerkan, kemudian diekuiliberasi selama 25 menit pada suhu 4 °C, kemudian disimpan beku pada suhu -80 °C selama 48 jam. Sperma kemudian dicairkan pada suhu 40 °C selama 13 detik. Viabilitas, motilitas dan persentase fertilisasi dievaluasi. Hasil uji analisis sidik ragam menunjukkan bahwa kombinasi metanol 10% dengan beberapa konsentrasi larutan madu berpengaruh secara signifikan ($P < 0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa dan persentase fertilisasi, tapi tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa ($P > 0,05$). Kombinasi larutan madu 0,1% dan metanol 10% menunjukkan persentase tertinggi baik motilitas ($89,4 \pm 5,45\%$), viabilitas ($85,75 \pm 4,79\%$), maupun persentase fertilisasi ($98,55 \pm 1,69\%$). Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa larutan madu 0,1% yang dikombinasikan dengan metanol 10% dalam larutan Ringer merupakan krioprotektan terbaik bagi spermatozoa *C. macracanthus* yang disimpan pada suhu -80 °C selama 48 jam.

Kata penting: ikan botia, larutan Ringer, madu, metanol, preservasi spermatozoa.

Abstract

The purpose of study was to obtain the best combination of natural cryoprotectant (honey solution) and synthetic cryoprotectant (methanol) on the quality of spermatozoa *Chromobotia macracanthus* Bleeker 1852, after freezing at -80 °C for 48 hours. The combination of 10% methanol with various concentrations of honey solution (0%, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% and 0.9%) was tested in this study. Ringer's solution was used as an extender. The diluted sperm was then equilibrated for 25 minutes at 4 °C, then frozen at -80 °C for 48 hours. The sperm was then thawed at 40 °C for 13 seconds. Viability, motility and percentage of fertilization were evaluated. The results of the analysis of variance showed that the combination of 10% methanol with several concentrations of honey solution had a significant effect ($P < 0.05$) on the viability of spermatozoa and the percentage of fertilization, but had no effect on sperm motility ($P > 0.05$). The combination of 0.1% honey solution and 10% methanol showed the highest percentage of both motility ($89.4 \pm 5.45\%$), viability ($85.75 \pm 4.79\%$), and the percentage of fertilization ($98.55 \pm 1.69\%$). The conclusion of this study is that 0.1% honey solution combined with 10% methanol in Ringer's solution is the best cryoprotectant for *C. macracanthus* spermatozoa stored at -80 °C for 48 hours

Key words: botia fish, honey, methanol, preservation of spermatozoa, Ringer's solution

Pendahuluan

Botia *Chromobotia macracanthus* Bleeker 1852 adalah salah satu ikan hias air tawar yang populer yang berasal dari Sumatera dan Kalimantan (Kottelat *et al.* 1996). Ikan botia di alam telah mengalami penurunan populasinya karena penangkapan yang berlebihan sekitar

2300 spesimen di sungai Musi pada tahun 2006, dan ekspor juvenile *C. macracanthus* sekitar 50 juta pada tahun 2009 (Ng & Tan 1997; Legendre *et al.* 2012; Hossain Md *et al.* 2015; Hossen Md *et al.* 2016; Hossain Md *et al.* 2017). Penurunan populasi ikan botia juga disebabkan oleh penebangan pohon di hutan secara ilegal (IBSAP

2003; Onrizal *et al.* 2005; Tlustý *et al.* 2008, Lakra *et al.* 2010; Raghavan, *et al.* 2013; Gupta *et al.* 2015; Hossain Md *et al.* 2015; Afros *et al.* 2016; Hossen Md *et al.* 2016, Islam Md *et al.* 2017). Studi tentang bioekologi ikan botia telah dilakukan oleh beberapa peneliti (Tan & Kottelat 2009; Legendre *et al.* 2012; Kottelat 2013; Dey & Barat 2015; Dey *et al.* 2015; Gupta 2016; Hossain Md *et al.* 2017), demikian pula dengan keberhasilan teknologi budidaya juga telah dilaporkan (Tan & Kottelat 2009; Legendre *et al.* 2012; Kottelat 2013; Dey & Barat 2015; Dey *et al.* 2015; Gupta 2016; Hossain Md *et al.* 2017). Oleh karena itu produksi ikan botia untuk memenuhi permintaan pasar tidak lagi mengandalkan pada alam (dari habitat alaminya) namun berdasarkan produksi akuakultur (Tan & Kottelat 2009; Legendre *et al.* 2012; Kottelat 2013; Dey & Barat 2015; Dey *et al.* 2015; Gupta 2016). Namun demikian produksi benih ikan botia masih menghadapi beberapa kendala terutama penyediaan induk yang berkualitas. Hal ini disebabkan pematangan gonad yang lama (8-10 bulan) serta tidak sinkronnya pematangan gonad antara induk jantan dan betina (Satyani dkk. 2006; Legendre *et al.* 2012; Permana *et al.* 2015; Musthofa *et al.* 2018; Putra *et al.* 2019). Oleh karena itu salah satu solusi untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan kriopreservasi sperma (Muchlisin *et al.* 2004; Tiersch *et al.* 2008; Yang & Tiersch 2009; Cabrita *et al.* 2010; Agarwal 2011; Chew *et al.* 2012; Muchlisin *et al.* 2015; Jang *et al.* 2017; Martínez; Riesco *et al.* 2017; Hezavehei *et al.* 2018). Menurut Tsai & Lin (2012), kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan sel pada suhu sangat rendah dalam jangka waktu lama.

Beberapa spesies ikan telah berhasil dikriopreservasi spermatozoanya, antara lain lele

bagrid *Hemibagrus nemurus* (Muchlisin *et al.* 2004; Muchlisin *et al.* 2009), lele Africa *Clarias gariepinus* (Viveiros *et al.* 2000; Muchlisin *et al.* 2005; Muchlisin *et al.* 2010; Omitogun *et al.* 2010; Muchlisin *et al.* 2015; Olanrewaju *et al.* 2015), gurami *Osphronemus goramy* (Abinawanto *et al.* 2012a; Abinawanto *et al.* 2017a), tawes (*Barbonymus gonionotus*) (Abinawanto *et al.* 2013; Abinawanto *et al.* 2016), spermatozoa Salmonidae (Harvey & Ashwood-Smith, 1982; Negus 2008; Figueroa *et al.* 2018; Lahnsteiner *et al.* 2002; Figueroa *et al.* 2016), ikan mas *Cyprinus carpio* (Horvath *et al.* 2003; Withler 1982; Bernáth *et al.* 2016; Horvath *et al.* 2007; Boryshpolets *et al.* 2017; Magyary *et al.* 1996), zebra fish *Danio rerio* (Harvey *et al.* 1982; Carmichael *et al.* 2009; Matthews *et al.* 2018; Rebocho 2018), ikan nila (*Oreochromis mossambicus*) (Harvey 1983; Ugwu *et al.* 2018), rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Stoss & Donaldson 1983; Kutluyer *et al.* 2014; Robles *et al.* 2003; Bozkurt *et al.* 2005; Tekin *et al.* 2003; Ciereszko *et al.* 2014), dan ikan seurukan *Osteochillus vittatus* (Muthmainnah *et al.* 2018). Namun demikian, studi tentang kriopreservasi sperma ikan botia belum pernah dilaporkan.

Krioprotektan merupakan salah satu faktor yang menunjang keberhasilan program kriopreservasi (Muchlisin 2005; Agarwal 2011; Anil *et al.* 2011; Chew *et al.* 2012; Tsai & Lin 2012; Muchlisin *et al.* 2015; Gil *et al.* 2017). Hal ini disebabkan krioprotektan dapat melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin dan kejutan panas (Muchlisin 2005; Anil *et al.* 2011; Tsai & Lin 2012; Ciereszko *et al.* 2014; Gil *et al.* 2017). Namun demikian, krioprotektan bersifat toksik pada konsentrasi tinggi terhadap sistem selular termasuk spermatozoa (Muchlisin *et al.* 2009; Tsai & Lin 2012; Anil 2013; Best 2015;

Muchlisin *et al.* 2015; Sieme *et al.* 2016). Oleh karena itu, krioprotektan yang tidak toksik sangat dibutuhkan dalam proses kriopreservasi (Dash *et al.* 2008; Anil 2011; Szurek & Eroglu 2011; Tsai & Lin 2012; Muchlisin *et al.* 2015). Krioprotektan secara umum terdiri atas dua tipe yaitu, krioprotektan intraseluler (permeating) dan ekstraseluler (nonpermeating). Hasil studi sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan kombinasi kedua tipe krioprotektan memberikan hasil yang terbaik. Sebagai contoh, Abinawanto *et al.* (2012b; 2016) menggunakan kombinasi susu skim dan metanol untuk kriopreservasi spermatozoa ikan tawes *Barbonymus gonionotus*, kombinasi sukrosa dan metanol untuk kriopreservasi spermatozoa ikan gurami (Abinawanto *et al.* 2012a) kombinasi larutan madu dan Dimethyl Sulfoxide (DMSO) untuk kriopreservasi spermatozoa ikan gurami (Abinawanto *et al.* 2017a) dan spermatozoa ikan nilam (*Osteochillus hasseltii*) (Sunarma *et al.* 2007), serta kombinasi kuning telur dan DMSO untuk kriopreservasi spermatozoa ikan depik (*Rasbora tawarensis*) (Muthmainnah *et al.* 2018). Kombinasi larutan madu dan DMSO telah berhasil digunakan untuk kriopreservasi spermatozoa ikan gurami (Abinawanto *et al.* 2017a) namun demikian penggunaan kombinasi larutan madu dan metanol serta larutan Ringer sebagai ekstender untuk kriopreservasi spermatozoa ikan botia belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi larutan madu terbaik dikombinasikan dengan metanol 10% untuk kriopreservasi spermatozoa ikan botia pada suhu -80°C selama 48 jam.

Bahan dan metode

Waktu, lokasi dan persiapan induk

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2017 hingga Januari 2018, di Balai Riset Budi-daya Ikan Hias (BRBIH), Depok, Jawa Barat. Sebanyak 40 ekor induk ikan botia jantan dengan bobot tubuh berkisar 40 – 80 g dipelihara selama 2 bulan di panti benih ikan botia BRBIH menggunakan bak kanvas bulat berukuran diameter 2,5 m dan tinggi 1 m (ketinggian air 0,5 m) dengan sistem resirkulasi. Ikan botia diberi pakan berupa cacing tanah (*Lumbricus* sp.) secara *ad satiation* (sekenyangnya), sebanyak 1 kali per hari. Pemeliharaan dilakukan pada suhu 24-25°C (Satyani *et al.* 2006). Tahapan berikutnya yaitu seleksi induk matang gonad yang dilakukan dengan cara mengurut bagian abdomen induk jantan secara perlahan. Induk jantan yang matang gonad dicirikan mampu memproduksi sperma berwarna putih susu (Satyani *et al.* 2006). Induk hasil seleksi kemudian dipindahkan ke akuarium dengan ukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm yang dilengkapi dengan aerasi dan jaring kasa ukuran mata jaring 0,5 cm untuk mencegah ikan loncat keluar. Selanjutnya ikan jantan siap untuk di-induksi secara hormonal.

Pembuatan larutan ekstender dan krioprotektan

Larutan ekstender yang digunakan dalam penelitian ini yaitu larutan Ringer, sedangkan larutan madu digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler, sementara metanol 10% digunakan sebagai krioprotektan intraseluler. Larutan Ringer stok dibuat dengan cara melarutkan 3,25 g NaCl; 0,125 g KCl; 0,175 g CaCl₂.2H₂O; dan 0,1 g 0,1 g dalam akuades 500 mL, dan larutan disimpan pada suhu 4°C (Abinawanto *et al.* 2017a). Larutan madu dibuat dengan cara melarutkan masing-masing 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; dan

0,9 mL madu murni dengan larutan Ringer sehingga diperoleh konsentrasi larutan madu masing-masing 0,1%; 0,3%; 0,5%; 0,7%; dan 0,9% (Abinawanto *et al.* 2017a). Pembuatan larutan madu dilakukan pada tabung kriogenik 2mL berdasarkan metoda Abinawanto *et al.* (2017a) dan studi pendahuluan.

Pembuatan larutan aktivator dan larutan eosin-Y.

Larutan aktivator dibuat dengan melarutkan 0,263 g NaCl; 0,037 g KCl; dan 0,363 g Tris_HCl dengan akuabides 100 mL. Larutan aktivator disimpan pada suhu 4 °C sampai saat digunakan (Perchec *et al.* 1995). Larutan eosin-Y dibuat dengan melarutkan 0,5 g eosin-Y dengan akuabides 100 mL (Abinawanto *et al.* 2017b).

Pengoleksian sperma

Empat ekor jantan masing-masing dengan bobot $60,47 \pm 10,34$ g disuntik dengan Ovaprim (Syndel Laboratories Ltd. Nanaimo, Canada) secara intramuskular pada dosis 0,6 mL per kg bobot tubuh (Legendre *et al.* 2012). Sperma dikoleksi dari setiap individu ikan jantan 18 jam pasca penyuntikkan dengan cara mengurut bagian abdomen tubuh ikan (stripping) dan ditempatkan dalam tabung kriogenik 2 mL (Muchlisin *et al.* 2010).

Pengenceran sperma

Sperma segar dicampur dengan larutan Ringer, metanol 10%, dan masing-masing larutan madu sesuai dengan konsentrasi larutan madu yang digunakan (Tabel 1). Komposisi larutan yang digunakan dimodifikasi dari Abinawanto *et al.* (2017a). Rasio pengenceran antara sperma segar dengan larutan pengencer yaitu 1:9 (Sunarma *et al.* 2007). Adapun komposisi masing-masing komponen larutan pengencer dan sperma disajikan dalam Tabel 1.

Ekuilibrasi, pembekuan, dan pencairan

Sperma yang telah diencerkan kemudian diekuilibrasi pada suhu 4-5°C di kotak es selama 15 menit, dan dibekukan selama 48 jam pada suhu -80 °C (Abinawanto *et al.* 2012a). Sperma beku kemudian dicairkan pada suhu 40 selama 10 menit di dalam water bath (Abinawanto *et al.* 2017a).

Evaluasi kualitas sperma

Sperma segar divalusi warna dan pH (Abinawanto *et al.* 2017a) Sperma yang telah disimpan beku dianalisis motilitas, viabilitas, dan abnormalitasnya dengan menggunakan Mikroskop Trinokular (Boeco, Germany) yang dilengkapi dengan kamera digital (MDCE-5a). Mikroskop dihubungkan dengan computer yang dilengkapi dengan perangkat lunak (Scopephoto 2.0.4).

Tabel 1 Komposisi pelarut yang digunakan untuk kriopreservasi sperma ikan botia (*Chromobotia macracanthus*)

Komposisi	Kelompok eksperimen					
	K	M 0,1%	M 0,3%	M 0,5%	M 0,7%	M 0,9%
Sperma (μL)	30	30	30	30	30	30
Metanol (μL)	30	30	30	30	30	30
Larutan madu (μL)	0	240	240	240	240	240
Fish Ringer (μL)	240	0	0	0	0	0

K = Kontrol, tanpa larutan madu; M 0,1–0,9% = larutan madu.

Pengoleksian telur yang terfertilisasi

Telur dikoleksi dari induk betina yang telah matang gonad dengan cara pengurutan pada bagian abdominal (stripping), dan diletakkan di dalam wadah plastik serta disimpan pada suhu 4 °C sampai saat digunakan untuk fertilisasi. Sebanyak 2 mL telur (100 butir telur) dicampur dengan 0,6 mL sperma yang telah dicairkan (1:3 volume per volume) dan ditambahkan dengan dua tetes air kolam dan diaduk dengan bulu ayam. Campuran sperma dan telur dibiarkan kontak selama lima menit. Fertilisasi terjadi dua jam pasca inkubasi. Telur yang terfertilisasi terlihat transparan, sedangkan telur yang tidak terbuahi berwarna gelap. Persentase fertilisasi dihitung dengan rumus sebagai berikut: Persentase fertilisasi = jumlah telur yang terbuahi dibagi dengan jumlah telur total yang diinkubasi dikali 100 persen (Anil 2013).

Analisis statistik

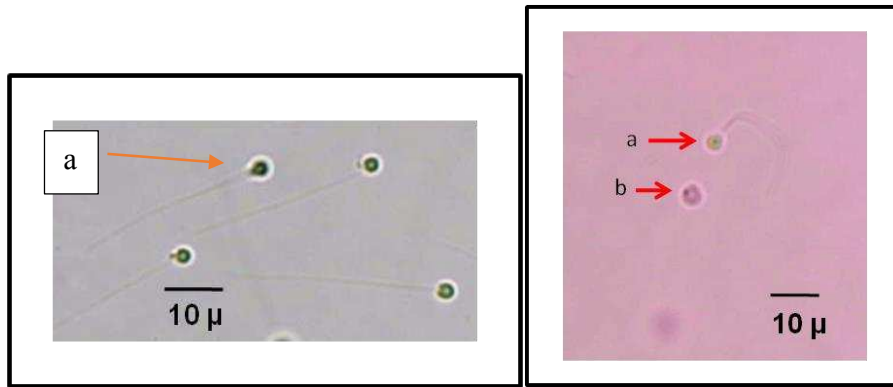
Data motilitas, viabilitas, dan fertilisasi dianalisis menggunakan ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mendapatkan hasil yang terbaik di antara perlakuan. Analisis data dilakukan dengan perangkat lunak SPSS 14 (SPSS, Chicago, IL, USA). Data kualitatif seperti warna, volume, pH dan abnormalitas spermatozoa disajikan secara deskriptif. Data fisika air selama pemeliharaan ikan botia yang diamati hanya suhu air berdasarkan metoda Satyani *et al.* (2006)

Hasil

Suhu air selama pemeliharaan ikan botia berkisar antara 24-25 °C. Sperma segar berwarna putih susu, dan pH 7,9 (Tabel 2). Diameter kepala spermatozoa 3,5 µm, dan rata-rata

panjang ekor spermatozoa 32,81 µm. Spermatozoa yang viable berwarna hijau pada bagian kepala (Gambar 1a dan 1b), sedangkan spermatozoa yang nonviabel berwarna merah muda sampai merah di bagian kepalanya (Gambar 1c). Kualitas spermatozoa segar secara umum lebih baik dibandingkan spermatozoa yang dikriopreservasi. Persentase motilitas, viabilitas, dan fertilisasi dari sperma segar, masing-masing: $97,75 \pm 2,63\%$, $83 \pm 2,45\%$, dan $100 \pm 0,0\%$. Namun demikian, kualitas spermatozoa menurun secara gradual 48 jam pasca penyimpanan beku, bergantung pada konsentrasi larutan madu. Hasil uji ANOVA menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap viabilitas dan fertilisasi spermatozoa ($P < 0,05$), namun tidak berpengaruh secara signifikan terhadap motilitas spermatozoa ($P > 0,05$).

Kualitas spermatozoa semakin menurun sejalan dengan peningkatan konsentrasi larutan madu. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa pada perlakuan dengan larutan madu 0,1% sebesar $89,4 \pm 5,45\%$, lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi larutan madu lainnya, namun tidak signifikan (Tabel 2). Viabilitas spermatozoa pada perlakuan dengan konsentrasi larutan madu 0,1% sebesar $85,75 \pm 4,78\%$ lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan dengan konsentrasi madu lainnya, kecuali kontrol ($74,5 \pm 7,89\%$) (Tabel 2). Persentase fertilisasi tertinggi juga ditunjukkan oleh perlakuan dengan konsentrasi larutan madu 0,1% yaitu sebesar $98,55 \pm 1,69\%$ berbeda signifikan dengan konsentrasi larutan madu 0,5%, 0,7%, dan 0,9%, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi larutan madu 0,3% dan 0% (kontrol) (Tabel 2).



Gambar 1 Spermatozoa viabel (a) dan spermatozoa nonviabel (b). Perbesaran 10 x 100; Bar = 10 mikrometer

Tabel 2 Analisis spermatozoa ikan botia pasca pembekuan 48 jam

Kelompok eksperimen	Parameter kualitas sperma		
	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	Fertilisasi (%)
Sperma segar	97,75 ± 2,63 ^b	83 ± 2,45 ^b	100 ± 0,0 ^b
0% (kontrol)	85,45 ± 11,99 ^a	74,5 ± 7,89 ^{ab}	91,61±10,29 ^{ab}
M 0,1%	89,4 ± 5,45 ^a	85,75 ± 4,78 ^b	98,55±1,69 ^b
M 0,3%	83,05 ± 4,18 ^a	67 ± 10,23 ^a	93,91±9,33 ^{ab}
M 0,5%	81,15 ± 8,14 ^a	66,75 ± 9,56 ^a	89,67±8,22 ^a
M 0,7%	81,9 ± 7,05 ^a	66,5 ± 14,07 ^a	84,46±10,22 ^a
M 0,9%	82,27 ± 6,18 ^a	67 ± 14,07 ^a	82,39±16,90 ^a

Keterangan: Nilai rata-rata ± simpangan baku dari empat kali ulangan. Nilai rata-rata yang memiliki huruf yang sama berarti tidak memiliki perbedaan signifikan ($p > 0.05$).

Pembahasan

Penggunaan kombinasi larutan madu dengan konsentrasi 0,1% dengan metanol 10% dalam larutan Ringer menunjukkan hasil terbaik terhadap kualitas spermatozoa 48 jam setelah pembekuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas spermatozoa pada kontrol (tanpa diberikan larutan madu) lebih rendah dibandingkan dengan yang diberikan perlakuan larutan madu 0,1%. Namun demikian, kualitas spermatozoa setelah penyimpan beku (kriopreservasi) menurun secara gradual pada konsentrasi larutan madu di atas 0,1%. Hal ini kemungkinan disebabkan peningkatan viskositas pelarut akibat

peningkatan konsentrasi larutan madu (Sakri 2015), sehingga menghalangi metanol masuk ke dalam sel spermatozoa. Sebagai akibatnya konsentrasi madu yang sangat kental tersebut dapat menurunkan efek protektif krioprotektan intraseluler (methanol) di dalam sel. Madu juga dikenal sebagai krioprotektan alami nonpermeating (ekstraseluler). Madu sebagai krioprotektan alami bersifat kurang toksik, tidak mahal, dan ramah lingkungan (Muchlisin *et al.* 2015; Muchlisin 2005). Oleh karena itu, penggunaan krioprotektan alami sebagai alternatif, sangat direkomendasikan, namun dengan konsentrasi optimum.

Motilitas spermatozoa yang dihasilkan dari kombinasi metanol 10% + larutan madu 0,1% pada studi ini sebesar $89,4 \pm 5,45\%$, lebih tinggi daripada penelitian sebelumnya yaitu 83,23% (dari hasil kombinasi metanol 5% + susu skim 20% +) (Abinawanto *et al.* 2016), 81,62% (dari hasil kombinasi metanol 10% + sukrosa 0,5%) (Abinawanto *et al.* 2012a), 80,98% (dari kombinasi 10% metanol + susu skim 15%) (Abinawanto *et al.* 2012b), 80,48% (dari kombinasi DMSO 10% + larutan madu 0,7%) (Abinawanto *et al.* 2017a), 63,33% (dari kombinasi DMSO + larutan madu) (Sunarma *et al.* 2007), dan 58% (dari kombinasi DMSO + larutan Ringer) (Muchlisin *et al.* 2004; Akcay *et al.* 2004). Oleh karena itu diasumsikan bahwa kombinasi metanol 10% dan larutan madu 0,1% merupakan krioprotektan yang efektif untuk mempertahankan kualitas spermatozoa ikan botia selama kriopreservasi. Penelitian ini menggunakan larutan madu sebagai krioprotektan ekstraseluler (nonpermeating) dan metanol 10% sebagai krioprotektan intraseluler (permeating). Penggunaan kedua jenis krioprotektan tersebut secara simultan menghasilkan efek krioprotektif yang lebih baik, karena memberikan efek perlindungan yang komplementer di dalam dan di luar sel (Akcay *et al.* 2004). Selain efektif melindungi spermatozoa ikan botia pada penelitian ini, maka kombinasi metanol dan larutan madu juga berhasil melindungi spermatozoa pada ikan lain, seperti spermatozoa ikan lele bagrid (Muchlisin *et al.* 2004), lele Afrika (Muchlisin *et al.* 2015), dan nilem (Sunarma *et al.* 2007). Motilitas spermatozoa ikan botia pasca penyimpanan beku pada penelitian ini juga lebih tinggi dibandingkan dengan motilitas spermatozoa ikan lainnya, seperti pada ikan lele Afrika (Muchlisin *et al.* 2004), gurami (Abinawanto *et al.* 2017a), dan

nilem (Sunarma *et al.* 2007). Persentase fertilisasi pasca penyimpanan beku spermatozoa pada penelitian ini juga lebih tinggi dibandingkan spesies ikan lele Afrika (Muchlisin *et al.* 2015), tawes (Abinawanto *et al.* 2016), ikan gurami (Abinawanto *et al.* 2017a), ikan nila (Rebocho 2018), nilem (Sunarma *et al.* 2007; Putra *et al.* 2019), lele Afrika (Muchlisin *et al.* 2004), ikan mas (Akcay *et al.* 2004), dan *Lota lota* (Lahnsteiner *et al.* 2002). Mekanisme yang dapat menjelaskan mengapa kombinasi larutan madu + methanol dapat meningkatkan viabilitas dan persentase fertilisasi kemungkinan adalah madu sebagai bahan alami memiliki keunggulan tidak bersifat toksik dibandingkan krioprotektan sintetik seperti polivinil pirolidon, sehingga dapat mempertahankan viabilitas, bahkan meningkatkan viabilitas spermatozoa. Madu juga berperan sebagai penyedia energi selama penyimpanan (dalam keadaan metabolisme basal), sehingga dapat meningkatkan persentase fertilisasi pasca penyimpanan beku. Selain itu, walau digunakan methanol sebagai krioprotektan sintetik, namun toksisitasnya relatif lebih rendah dibanding krioprotektan sintetik lainnya seperti DMSO. Dengan demikian maka, kombinasi madu dan methanol memperlihatkan hasil yang terbaik dibandingkan dengan kombinasi krioprotektan yang digunakan pada penelitian sebelumnya.

Simpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa kombinasi larutan madu 0,1 % dan metanol 10% merupakan krioprotektan yang efektif bagi penyimpanan sperma ikan botia (*Chromobotia macracanthus*) pada suhu-80 °C selama 48 jam.

Persantunan

Penelitian ini dibiayai oleh Universitas Indonesia dengan nomor kontrak 609/UN2.R3.1/HKP.05.00/2017. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada bapak Taryana dan ibu Asri Martini yang telah membantu menyiapkan peralatan dan bahan penelitian, serta bak pemeliharaan ikan.

Daftar pustaka

- Abinawanto, Nurman K, Lestari R. 2012a. The effect of sucrose on sperm quality of Goramy fish, *Osphronemus goramy* Lacepede, 1801 two days post cryopreservation. *Journal of Agricultural Science and Technology. B.*, 2(2B):204-207.
- Abinawanto, Anindita I, Lestari R. 2012b. Cryopreservation of spermatozoa of *Osphronemus goramy* fish using skim milk. *International Journal of Engineering and Innovation Technology*, 2(5): 62-4.
- Abinawanto, Pratiwi IA, Lestari R. 2017a. Sperm motility of giant gourami (*Osphronemus goramy*, Lacepede, 1801) at several concentrations of honey combined with DMSO after short-term storage. *AACL Bioflux*, 10(2): 156-163.
- Abinawanto A, Putri PE. 2017b. Goramy spermatozoa quality after subzero freezing: the role of coconut water as the cryoprotectant. *Cell Biology and Development*, 1(1): 1-5.
- Abinawanto, Rahayu S, Lestari R. 2013. Cryopreservation of Java barb (*Barbonymus gonionotus*) spermatozoa using egg yolk as a cryoprotectant. *Global Veterinaria*, 10(3): 318-321.
- Abinawanto, Zuraida, Lestari R. 2016. The effect of skim milk combined with 5% of metanol on motility, viability, and abnormality of Java barb, *Barbonymus gonionotus* spermatozoa after 24 hours freezing. *AACL Bioflux*, 9(2): 326-333.
- Afros S, Ahmed N. 2016. Effect of degraded ecosystem on fish biodiversity in the Old Brahmaputra River, Bangladesh and Its conservation measures. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 10(9):37-43.
- Agarwal NK. 2011. Cryopreservation of fish semen. In: Bhatt JP, Thapliyal M, Thapliyal A (Editors). *Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology*. Transmedia Publication, Srinagar (Garhwal) Uttarakhand, India. pp. 104-127.
- Anil S. 2013. Development of invitro culture and cryopreservation protocol for Zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue fragments. PhD thesis. University of Bedfordshire. 198 p.
- Anil S, Ghafari F, Zampolla T, Rawson DM, Zhang T. 2011. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue fragment. *CryoLetters*, 32(1): 40-50.
- Akçay E, Bozkurt Y, Secer S, Tekin N. 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(5): 837-43.
- Bernáth G, Bokor Z, Žarski D, Várkonyi L, Hegyi A, Staszny A, Urbányi B, Ifj JR, Horváth, A. 2016. Commercial-scale out-of-season cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm and its application for fertilization. *Animal Reproduction Science*, 170:170-177.
- Best BP. 2015. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*, 18(5): 422-36.
- Boryshpolets S, Sochorová D, Rodina M, Linhart O, Dzyuba B. 2017. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm: impact of seeding and freezing rates on post-thaw outputs. *Biopreservation and Biobanking*, 15(3): 234-40.
- Bozkurt Y, Seçer S, Tekin N, Akçay E. 2005. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) sperm with glucose based extender. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1(1): 21-25.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martinez-Paramo S, Robles V, Beirao J, Peres-Carezales S, Herraes P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 623-635.
- Carmichael C, Westerfield M, Varga ZM. 2009. Cryopreservation and in vitro fertilization at the Zebrafish International Resource Center. *Methods in Molecular Biology* 546: 45-65.

- Chew C, Zulkafli AR. 2012. Sperm cryopreservation of some freshwater fish species in Malaysia. In: Igor I. Katkov (editor). *Current Frontiers in Cryopreservation*. Intech., 269–293.
- Ciereszko A, Dietrich GJ, Nynca J, Dobosz S, Zalewski T. 2014. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucosemethanol extender. *Aquaculture*, 420: 275-281.
- Dash SN, Routray P, Dash C, Guru BC, Swain P, Sarangi N. 2008. Use of the nontoxic cryoprotectant trehalose enhances recovery and function of fish embryonic stem cells following cryogenic storage. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 3(4): 277-287.
- Dey A, Barat S. 2015. Spawning biology and captive breeding of vulnerable loach *Botia histrionica* (Blyth) in Cooch Behar, West Bengal, India. *Journal of Experimental Biology*, 5(10): 46-48.
- Dey A, Sarkar D, Barat S. 2015. Spawning biology, embryonic development and captive breeding of vulnerable loach *Botia dario* (Hamilton). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3:183–188.
- Figuerola E, Farias JG, Lee-Estevez M, Valdebenito I, Risopatrón J, Magnotti C, Romero J, Watanabe I, Oliveira RPS. 2018. Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 493: 1-8.
- Figuerola E, Valdebenito I, Merino O, Ubilla A, Risopatrón J, Farias JG. 2016. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *Journal of Fish Biology*, 89(3):1537-1550.
- Gil HW, Lee TH, Park IS. 2017. Effects of Cryoprotectants and Diluents on the Cryopreservation of Spermatozoa from Far Eastern Catfish, *Silurus asotus*. *Development & Reproduction*, 21(1): 71.
- Gupta N, Sivakumar K, Mathur VB, Chadwick MA. 2015. Terrestrial protected areas and managed reaches conserve threatened freshwater fish in Uttarakhand, India. *Parks*, 21(1): 89-101.
- Harvey B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32(3-4): 313–20.
- Harvey B, Ashwood-Smith MJ. 1982. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology*, 19(1): 29–40.
- Hezavehei M, Mohsen S, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3): 327-339.
- Horvath L, Miskolczi E, Urbanyi B. 2003. *Cryopreservation of common carp sperm*. *Aquatic Living Resources*, 16(5):457-460.
- Horvath Á, Miskolczi E, Mihálffy S, Ősz K, Szabó K, Urbányi B. 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54(3): 251-257.
- Hossain Md Y, Hossen Md A, Ahmed ZF, Yahya K, Rahman Md M, Ahmed F, Ohtomi J. 2015. Threatened fishes of the world: *Botia dario* (Hamilton, 1822) (Cypriniformes: Cobitidae). *Croatian Journal of Fisheries*, 73(2): 86 – 88
- Hossain Md Y, Hossen Md A, Pramanik Md NU, Nawar F, Rahman Md M, Sarmin, S, Khatun D, Bahkali AH, Ergoban AM, Yahya K. 2017. Life-History Traits of the Endangered Carp *Botia dario* (Cyprinidae) from the Ganges River in Northwestern Bangladesh. *Pakistan Journal of Zoology*, 49(3): 801-809
- Hossen Md A, Hossain Md Y, Pramanik Md NU, Nawar F, Khatun D, Parvin MF, Rahman Md M. 2016. Morphological characters of *Botia lohachata*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(9): 689-692
- Indonesian Biodiversity Strategy and Action Plan (IBSAP). 2003. National document. National Development Planning Agency (Bappenas).: Indonesia 160 p
- Islam Md A, Asif A Al, Samad Md A, Sarker B, Ahmed M, Satter AMA, Hossain AA. 2017. Comparative study on fish biodiversity with conservation measures of the Bhairabriver, Jessore, Bangladesh. *Journal of Medical and Biological Research*, 3(3): 357-67.
- Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. 2017. Cryopreservation and its clinical

- applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1): 12-8.
- Kottelat M. 2013. The fishes of the inland waters of southeast asia: a catalogue and core bibliography of the fishes known to occur in freshwaters, mangroves and estuaries. *The Raffles Bulletin Supplement Zoology*, 27: 1–663
- Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirjo-atmodjo S. 1996. Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Periplus Ltd. Jakarta: 221 p
- Kutluyer F, Kayim M, Öğretmen F, Büyükleblebici S, Tuncer PB. 2014. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*, 69(3): 462-466.
- Lahnsteiner F, Mansour N, Weismann T. 2002. The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). *Cryobiology*, 45(3): 195–203.
- Lakra WS, Sarkar UK, Kumar RS, Pandey A, Dubey VK, Gusain OP. 2010. Fish diversity, habitat ecology and their conservation and management issues of a tropical River in Ganga basin, India. *The Environmentalist*, 30(4): 306-19.
- Legendre M, Satyani D, Subandiyah S, Sudarto, Pouyaud L, Baras E, Slembrouck J. 2012. Biology and culture of the clown loach *Chromobotia macracanthus* (Cypriniformes, Cobitidae): 1-Hormonal induced breeding, unusual latency response and egg production in two populations from Sumatra and Borneo Islands. *Aquatic Living Resources*, 25(2): 95–108
- Magyary I, Urbanyi B, Horvath L. 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *Journal of Applied Ichthyology*, 12(2):117-9.
- Matthews JL, Murphy JM, Carmichael C, Yang H, Tiersch T, Westerfield M, Varga ZM. 2018. Changes to extender, cryoprotective medium, and in vitro fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation. *Zebrafish*, 15(3): 279-290.
- Muchlisin ZA. 2005. Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2005; 6(1): 66-69.
- Muchlisin ZA, Hashim R, Chong, AS. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology*, 62(1-2): 25–34.
- Muchlisin ZA, Nadiyah WN, Nadiya N, Fadli N, Hendri A, Khalil M, Siti-Azizah MN. 2015. Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*, Burchell 182 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. *Czech Journal of Animal Sciences*, 60(1): 10-5.
- Muchlisin ZA, Nadiya N, Nadiyah WN, Musman M, Siti-Azizah MN. 2010. Preliminary study on the natural extenders for artificial breeding of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *AACL Bioflux*, 3(2):119-124.
- Musthofa SZ, Wulandari R, Abinawanto A. 2018. Spawning biology and fertility of Clown Loach (*Chromobotia macracanthus* Bleeker 1852) in captivity. *Proceeding 3rd Int Symp Curr Progress in Math and Sci*. In AIP Conference Proceedings 2018. AIP Publishing LLC., 4 p.
- Muthmainnah CR, Eriani K, Hasri I, Irham M, Batubara AS, Muchlisin ZA. 2018. Effect of glutathione on sperm quality after short-term cryopreservation in seurukan fish *Osteochilus vittatus* (Cyprinidae). *Theriogenology*, 122: 30-34.
- Negus MT. 2008. Salmonid sperm cryopreservation techniques. Minnesota Department of Natural Resources. Division of Fish and Wildlife, Section of Fisheries. 167 p.
- Ng PKL, Tan HH. 1997. Freshwater fishes of Southeast Asia: potential for the aquarium fish trade and conservation issues. *Aquarium Sciences and Conservation*. 1997, 1(2): 79-90.
- Olanrewaju AN, Kareem OK, Orisasona O. 2015. Cryopreservation: A Viable Tool for Sustainable Catfish Aquaculture Industry in Nigeria. *Journal Fisheries Livestock Production*, 3(149): 4 p.
- Omitogun OG, Olaniyan OG, Oyeleye OF, Ojiokpota OO, Aladele C, Odofin SE, Odoflin WT. 2010. Potentials of short term

- and long term cryopreserved sperm of the African giant catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) for aquaculture. *African Journal of Biotechnology*, 9(41): 6973-6982
- Onrizal, Kusmana C, Saharjo BH, Handayani IP, Kato T. 2005. Social Environmental Issues of Danau Sentarum National Park, West Kalimantan. *Biodiversitas*, 6(3): 220-223.
- Perchec G, Jeulin C, Cosson J, André F, Billard R. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 108(2): 747-53.
- Permana A, Alimuddin, Hadi W, Priyadi A. 2015. Growth response of clown loach (*Chromobotia macracanthus* Bleeker 1852) juveniles immersed in water containing recombinant growth hormone. *Indonesian Aquaculture Journal*, 10(2): 125-130.
- Putra HFE, Sugianto S, Rahardjo P, Permana A. 2019. The artificially spawning of botia Fish (*Chromobotia macracanthus* Bleeker) with HCG (Human Chorionic Gonadotrophin) and LHRH-a (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analog) injection. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 6(3): 101-6.
- Raghavan R, Dahanukar N, Tlusty M, Rhyne A, Kumar K, Molur S, Rosser AM. 2013. Uncovering an obscure trade: Threatened freshwater fishes and the aquarium pet markets. *Biological Conservation*, 164: 158-69.
- Rebocho SRDMV. 2018. Development of a new ultrafast freezing procedure for zebrafish sperm cryopreservation (Doctoral dissertation).
- Riesco MF, Oliveira C, Soares F, Gavaia PJ, Dinis MT, Cabrita E. 2017. *Solea senegalensis* sperm cryopreservation: New insights on sperm quality. *PLoS One*, 12(10): 1-19.
- Robles V, Cabrita E, Cuñado S, Herráez MP. 2003. Sperm cryopreservation of sexreversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture*, 224(1-4): 203-212.
- Sakri FM. 2015. Honey and its efficacy: Healthy supplement without side effect. 1st Print. Diandra Indonesian Library, Yogyakarta. 84 p
- Satyani, D., H. Mundriyanto, S. Subandiyah, Chumaidi, Sudarto, P. Taufik, J. Slembrouck, M. Legendre & L. Pouyaud. 2006. *Teknologi Pembenihan ikan hias botia (Chromobotia macracanthus Bleeker) skala laboratorium*. Loka Riset Ikan Air Tawar. Depok: 19 hlm.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169: 2-5.
- Stoss J, Donaldson EM. 1983. Studies on Cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 31(1): 51-65.
- Sunarma A, Hastuti DW, Sistina Y. 2007. Combination effect of honey with different cryoprotectant on spermatozoa of the Indonesian shark minnow, *Osteochillus hasseltii* Valenciennes, 1842] after cryopreservation. *Proceeding Indonesian Aquaculture Conference 2007*, Surabaya, June 5-7, 2007. Indonesian Aquaculture Society, 1-9.
- Szurek EA, Eroglu A. 2011. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PloS One*, 6(11): 27604.
- Tan HH, Kottelat M. 2009. The fishes of the Batang Hari drainage, Sumatra, with description of six new species. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 20(1): 13-69.
- Tekin N, Secer S, Akcay E, Bozkurt Y. 2003. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli Journal of Aquaculture*, 55(3): 208-212.
- Tiersch TR. 2008. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37: 1-19.
- Tlusty MF, Dowd S, Raghavan PR. 2008. Saving forest through fisheries-ornamental Fisheries as means to avoid deforestation. *Ornamental Fish International Journal*, 56: 21-5.
- Tsai S, Lin C. 2012. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(3): 425-34.

- Ugwu SI, Kowalska A, Morita M, Kowalski RK. 2018. Application of glucosemethanol extender to cryopreservation of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) sperm. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(1): 41-50.
- Viveiros ATM, So N, Komen J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clark gariensis*: Cryoprotectants, freezing, and sperm dilution ratio. *Theriogenology*, 54(9): 1395-1408.
- Withler FC. 1982. Cryopreservation of spermatozoa of some freshwater fishes cultured in South and Southeast Asia. *Aquaculture*, 26(3-4): 395-398
- Yang H, Tiersch TR. 2009. Current Status of Sperm Cryopreservation in Biomedical Research Fish Models: Zebrafish, Medaka, and Xiphophorus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2): 224-232.