

SKRIPSI

PENGARUH BAHAN PENGECER YANG MENGANDUNG LESITIN TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) POST THAWING



Oleh :

DINAR RUMONDANG SIAHAAN

NIM 060911237

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

**Pengaruh bahan pengencer yang mengandung lesitin terhadap kualitas
spermatozoa Ikan mas (*Cyprinus carpio*) post thawing**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 24 Juni 2013



Dinar Rumondang Siahaan
NIM. 060911237

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 7 Juni 2013

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua	: Dr. Sri Pantja Madyawati, drh.,M.Si.
Sekretaris	: Dr. Suherni Susilowati, drh.,M.Kes.
Anggota	: Emy Koestanti Sabdoningrum,drh.,M.Kes.
Pembimbing Utama	: Prof. Mas'ud Hariadi, drh.,M.Phil.,Ph.D.
Pembimbing Serta	: Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes

Telah diuji pada

Tanggal : 25 Juni 2013

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua	: Dr. Sri Pantja Madyawati, drh.,M.Si.
Sekretaris	: Dr. Suherni Susilowati, drh.,M.Kes.
Anggota	: Emy Koestanti Sabdoningrum,drh.,M.Kes.
Pembimbing Utama	: Prof. Mas'ud Hariadi, drh.,M.Phil.,Ph.D.
Pembimbing Serta	: Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes

Surabaya, 25 Juni 2013

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh

NIP. 195312161978062001

THE EFFECT OF A DILUENT CONTAINED LECITHIN ON THE QUALITY POST THAWING CARP'S (*CYPRINUS CARPIO*) SPERMATOZOA

Dinar Rumondang Siahaan

ABSTRACT

The research was aimed to determine the effect of diluent contained lecithin with different concentrations of the post thawing sperm quality in Carp's (*Cyprinus carpio*). This research was conducted at the Center for Artificial Insemination (BBIB) Singosari, with type of research is true experiment in a Complete Random Design (CRD). Each group consisted of 3 treatments and 6 replications. The population in this study were male productive Carp with cement (mature gonad) as producer of spermatozoa exit Center for Artificial Fish Seed Mojokerto. The sample criteria used were Carp's cement among 1 years old male, with weight 0.7 kg and body length of 30-35 cm. The independent variable in this study was the concentration of diluents containing lecithin Andromed® P1 = 1:2, P2 = 1:4, P3 = 1:8. The dependent variable was the quality of the post thawing Carp's cement (*Cyprinus carpio*). Then the data result processed using Anova oneway and continued with Duncan test. Based of the result, it's indicated that the diluents containing lecithin Andromed® with in ranged concentrations showed a tangible influence against ($p < 0,05$) against the percentage of motility and viability. Highest average percentage obtained by 21.67% for motility and 23.67% viability on P2 treatment and lowest percentage obtained from P3 treatment with 9.50% for motility aspect and 12.67% for viability aspect.

Keyword : Lecithin, Post thawing Carp's (*Cyprinus carpio*) spermatozoa

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Esa atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh bahan pengencer yang mengandung lesitin terhadap kualitas spermatozoa Ikan mas (*Cyprinus carpio*) post thawing.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D, atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Alm. Herman Setyono, drh., MS, selaku pembimbing utama, Prof. Mas'ud Hariadi, drh., M.Phil., Ph.D sebagai dosen yang menggantikan almarhum dan Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes , selaku pembimbing serta atas saran dan bimbingannya sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.

Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si, selaku ketua penguji, Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes, selaku sekretaris penguji, dan Emy Koestanti Sabdoningrum, drh., M.Kes, selaku anggota penguji atas masukan yang telah diberikan dan Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc., selaku dosen wali atas bimbingan dan nasihat yang membangun selama ini.

Seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Ibu Drh. Sarastina selaku Kepala Laboratorium BBIB Singosari, Bapak Mufidz, Mas Taufik, Mbak Denis, Mbak Ana, Mbak Yeni, Mbak Any dan mbak Wiwid yang telah memberikan izin dan telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Kedua orang tua, Ayahanda Humala Siahaan dan Ibunda Ramenda br. Barus, kakak tercinta Gabriella Yulita R.S, adikku tersayang Evelina R.S dan Samuel Roberto A.S, yang telah memberikan nasihat, motivasi, doa dan dukungan baik secara materiil maupun spiritual dalam penyusunan skripsi ini. Serta abang Henryco yang tiada henti dalam memotivasi untuk memberikan dorongan, doa, dan semangat yang telah diberikan.

Sahabat-sahabat tercinta dan tersayang, Dewi Alima, Dea Wong, Hilda, Elsa, Elva, Virdha, Khoty, Nuraini, Bagus, Heri, teman-teman kelas B dan teman-teman seperjuangan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Angkatan 2009 atas semangat yang selalu ada baik dalam suka maupun duka. Serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan skripsi ini, terima kasih atas bantuan kalian.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak. Semoga hasil yang dituangkan dalam makalah ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Juni 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Landasan atau Dasar teori	4
1.4. Tujuan Penelitian	7
1.5. Manfaat Hasil Penelitian	7
1.6. Hipotesis	7
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 8
2.1. Biologi Ikan Mas	8
2.1.1. Taksonomi Ikan Mas	8
2.1.2. Morfologi Ikan Mas	8
2.1.3. Reproduksi Ikan Mas	10
2.2. Morfologi Spermatozoa	11
2.3. Perkembangan Spermatozoa	12
2.4. Lesitin	14
2.5. Pengencer Sperma	14
2.5. Pembekuan Sperma	15
2.6. <i>Thawing</i>	16
 BAB 3 BAHAN DAN METODE	 17
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2. Bahan dan Materi Penelitian	17
3.3. Metode Penelitian	17
3.3.1. Persiapan Penelitian	17
3.3.2. Penampungan dan Evaluasi Sperma	18
3.3.3. Perlakuan Pembuatan Diluter AndroMed®	20
3.3.4. Pembuatan Sperma Beku	21
3.3.5. Pemeriksaan <i>Post Thawing</i>	22
3.4. Variabel Penelitian	23
3.5. Identifikasi Operasional Variabel	23
3.5.1. Motilitas Spermatozoa	23

3.5.2. Viabilitas Spermatozoa	23
3.6. Rancangan Penelitian	24
3.7. Analisis Data	24
3.8. Alur Penelitian	25
BAB 4 HASIL PENELITIAN	26
4.1 Keadaan Spermatozoa Segar	26
4.2 Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	27
4.3 Pemeriksaan Persentase Viabilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	28
BAB 5 PEMBAHASAN	31
5.1 Evaluasi Kualitas Spermatozoa Segar	31
5.2 Evaluasi Kualitas	32
5.2.1. Motilitas Spermatozoa	32
5.2.2. Viabilitas Spermatozoa	35
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	38
6.1 Kesimpulan	38
6.2 Saran	38
RINGKASAN	39
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Rancangan Percobaan	20
4.1 Hasil Pemeriksaan Spermatozoa Segar Ikan Mas	26
4.2 Rerata dan Standart Deviasi Persentase Motilitas	
<i>Progresif Post Thawing</i>	27
4.3 Rerata dan Standart Deviasi Persentase Viabilitas <i>Post Thawing</i>	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Anatomi Ikan Mas	9
2.2 Morfologi Spermatozoa Ikan	11
2.3 Pola Umum Perkembangan <i>Sexual-product</i> pada Ikan	13
3.1 Diagram Alir Prosedur Penelitian	25
4.1 Grafik Persentase Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	29
4.2 Pemeriksaan Makroskopis Hidup-Mati Spermatozoa dengan perbesaran 400X dan Zoom In 40%	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Proses Pembuatan Semen Beku	45
2. Diluter Andromed®	46
3. Foto Alat dan Bahan Penelitian	47
4. Data Hasil Pemeriksaan Sel Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	49
5. Analisis Data	50

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Anova	: Analisis of variant
BBIB	: Balai Besar Inseminasi Buatan
CFU	: Cell Form Unit
cm ³	: Sentimeter kubik
Ditjennak	: Direktorat Jendral Produksi Peternakan
ml	: Mililiter
mm ³	: Milimeter kubik
n	: Ulangan
NaCl	: Natrium Chlorida
KKP	: Kementerian Kelautan dan Perikanan
Ph	: Potential of Hydrogen
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
t	: Perlakuan
%	: Persen
°C	: Derajat Celcius
μl	: Mikroliter
μm	: Mikrometer
±	: Kurang lebih

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan merupakan filum terbesar dari semua vertebrata yang hidup, sekitar 30.000 diantaranya merupakan jenis ikan dari total 50.000 vertebrata. Kehidupan ikan ini hampir setiap lingkungan akuatik di bumi, pada kisaran temperatur, salinitas, oksigen dan juga karakteristik kimia dan fisika. Lingkungan tersebut mengakibatkan tekanan pada ikan untuk beradaptasi dan menghasilkan keanekaragaman cara dalam melakukan reproduksi (Cabrita *et al.*, 2008).

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan. Ikan yang banyak dijadikan sebagai konsumsi masyarakat ini merupakan salah satu komoditas sektor perikanan air tawar yang terus berkembang pesat (Khairuman, 2002). Keunggulannya adalah karena rasa dagingnya yang enak dan gurih serta memiliki kandungan protein yang cukup tinggi.

Salah satu kegiatan budidaya ikan mas yaitu pembenihan merupakan hal terpenting. Saat ini di Indonesia belum terdapat pusat induk ikan yang menjamin keunggulan setiap jenis ikan, sehingga seleksi induk dan optimalisasi induk sangat dibutuhkan pada kegiatan pembenihan (Khairuman, 2008). Menurut Rustidja (2000), budidaya ikan membutuhkan teknik pembenihan yang menunjang pengembangan pemuliaan ikan (*breeding program*) baik dengan teknik reproduksi alami maupun buatan yang merupakan langkah alternatif dalam menyediakan

benih ikan yang akan digunakan, dengan demikian kesinambungan penyediaan induk matang gonad yang sehat dan berkualitas mutlak diperlukan.

Permasalahan pada budidaya ikan air tawar beranekaragam, salah satunya adalah rendahnya tingkat fertilitas dari spermatozoa di dalam air. Hal ini mengakibatkan banyaknya sel telur yang tidak terbuahi secara sempurna. Satu siklus reproduksi ikan dapat menghasilkan sel telur dan sperma sampai jutaan per ekor, tetapi yang terbuahi hanya mencapai 5% dari fertilisasi. Permasalahan lain adalah kurangnya ketersediaan cairan spermatozoa pada proses fertilisasi buatan. Rendahnya pembuahan spermatozoa dalam fertilisasi buatan ini juga disebabkan oleh aktivitas spermatozoa yang relatif singkat. Hal tersebut dapat disebabkan oleh singkatnya waktu viabilitas dan motilitas dari spermatozoa, sehingga kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil pada sel telur rendah. Volume cairan spermatozoa dapat ditingkatkan dengan rangsangan hormonal dan dapat juga dilakukan dengan pengenceran melalui penambahan larutan fisiologi (Hidayaturrehman, 2007).

Penyimpanan gamet jantan di luar tubuh ikan melalui penyimpanan spermatozoa telah lama dilakukan. Tujuan penyimpanan spermatozoa adalah untuk memudahkan transportasi spermatozoa dan melakukan persilangan antara jenis-jenis ikan yang waktu matang gonad yang berbeda (Fujaya, 2004). Sperma beku yang berkualitas tinggi dibutuhkan bahan pengencer yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa baik motilitas, viabilitas dan integritas membran spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan maupun pada saat *thawing* (Aboagla and Terada 2004).

Bahan pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengencer yang mengandung lesitin dan telah terbukti dapat menghindari terjadinya kontaminasi mikroorganisme karena pada pengencer yang mengandung lesitin ini tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur tetapi berasal dari sumber lesitin nabati yaitu kacang kedelai. Lesitin adalah suatu fosfolipid yang menjadi komponen utama fraksi fosfatida pada ekstrak kuning telur atau kacang kedelai yang diisolasi secara mekanik maupun kimiawi dengan menggunakan heksana (Surachman, 2006).

Pengencer yang telah dikembangkan dan mengandung lesitin adalah pengencer Andromed[®] dimana memiliki komposisi yang sama dengan pengencer tris kuning telur dan merupakan pengencer komersial berisi bahan kimia yang komplit namun tidak mengandung kuning telur. Andromed[®] mengandung zat nutrisi yang dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dan juga mengandung zat lipoprotein dan lesitin sehingga bisa digunakan dalam pengencer untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh kejut dingin (*cold shock*) (Surachman, 2006).

Pembekuan spermatozoa ikan belum banyak berkembang sehingga masih diperlukan penelitian-penelitian tentang pembekuan spermatozoa pada ikan baik dari segi prosedur dan teknik pelaksanaannya, karena yang banyak dipakai sekarang adalah teknik dan prosedur yang diadopsi dari hewan ternak. Masalah prosedur dan teknik pembekuan *post thawing* pada ikan masih diperlukan banyak penelitian, antara lain adalah jenis larutan pengencer serta waktu penyimpanan yang optimal masih belum banyak diketahui.

Berdasarkan penjelasan di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penggunaan bahan pengencer komersial yang mengandung lesitin terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) setelah pembekuan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah bahan pengencer yang mengandung lesitin dapat mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing*?
2. Berapakah konsentrasi yang tepat dalam bahan pengencer yang mengandung lesitin untuk dapat mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing*?

1.3 Landasan Teori

Ikan mas sebagai ikan konsumsi merupakan salah satu komoditas sektor perikanan air tawar yang terus berkembang pesat. Ikan mas merupakan jenis ikan yang mampu beradaptasi terhadap perubahan temperatur lingkungan 4-30°C. Saat ini telah terdapat beberapa *stain* ikan mas di Indonesia, diantaranya adalah ikan mas merah, majalaya, punten, si nyonya, taiwan, kumpay, kaca dan domas (Djarijah, 2001).

Optimalisasi induk dapat dilakukan melalui kriopreservasi atau pengawetan spermatozoa. Penyimpanan spermatozoa di luar tubuh ikan dapat dilakukannya pemijahan buatan dan dapat mengurangi jumlah ikan jantan yang

digunakan sehingga sel spermatozoa dapat disimpan dalam waktu yang tidak terbatas dan dapat digunakan kapan saja bila diperlukan (Fujaya,2004).

Keberhasilan penyimpanan spermatozoa ditentukan oleh kualitas bahan pengencer, rasio pengenceran, laju pembekuan dan pencairan kembali (Billard, *et al.*, 1995). Rustidja (2000) menyatakan bahwa manfaat bahan pengencer adalah untuk mengurangi aktifitas spermatozoa, dapat memperpanjang hidup spermatozoa dan juga dapat menjaga kualitas spermatozoa pada saat proses penyimpanan. Kualitas sperma (persentase hidup, motilitas dan lama hidup) akan terus menurun setelah dikeluarkan dari tubuh ikan (Rustidja, 2000). Penurunan kualitas sperma ikan dapat ditekan dengan pengawetan melalui pengenceran dan pendinginan.

Pengenceran berfungsi melindungi spermatozoa terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat, sumber energi, mencegah pengaruh yang merugikan seperti perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, menghambat pertumbuhan bakteri, meningkatkan volume spermatozoa sehingga dapat digunakan untuk inseminasi dan memproteksi sel spermatozoa selama proses pembekuan (Hafez,2000).

Penyimpanan spermatozoa dapat dilakukan dengan pendinginan maupun pembekuan. Pendinginan spermatozoa umumnya dilakukan pada suhu 4-5°C, sedangkan pembekuan spermatozoa dilakukan hingga suhu -196°C dalam nitrogen cair. Pada pembekuan spermatozoa umumnya terjadi kerusakan membran (permeabilitas sel menurun) akibat kejutan dingin (*cold shock*) dan pembentukan kristal es. *Cold shock* terjadi pada suhu kritis yaitu 4°C karena air di

dalam sel akan membentuk kristal es. Kejut dingin dapat menyebabkan spermatozoa mengalami penurunan aktifitas ekor dan kerusakan membran sel. Pembentukan kristal es di dalam sel akan mengakibatkan kerusakan membran sel secara mekanik karena penumpukan elektolit di dalam sel (Gazali dan Tambing, 2002).

Lesitin adalah nama populer untuk campuran fosfolipid. Kata lesitin berasal dari bahasa Yunani yaitu *lekihtos* yang berarti kuning telur. Kata lesitin mengalami perluasan makna dengan ditemukannya lesitin dari tumbuhan (nabati), hewan dan produk hewan lain khususnya susu. Lesitin hewan umumnya diperoleh dari kuning telur dan susu sedangkan lesitin nabati dapat diperoleh dari kacang kedelai, kacang tanah, gandum dan bunga matahari (Bousseau *et al.*, 1998).

Bousseau *et al.* (1998) membandingkan berbagai jenis pengencer dengan sumber lipoprotein dan lesitin yang berbeda, dilaporkan bahwa bahan pengencer yang mengandung kuning telur susu mengandung bakteri dan mycoplasma sebanyak 60 CFU/ml sedangkan yang mengandung lipoprotein dan lesitin nabati tidak ditemukan adanya mikroorganisme yang membahayakan baik bagi spermatozoa maupun saluran reproduksi betina. Usaha untuk mengurangi terjadinya kontaminasi mikroorganisme yang membahayakan bagi spermatozoa, telah dikembangkan bahan pengencer siap pakai dalam bentuk kemasan dengan sumber lesitin kacang kedelai. Bahan pengencer yang mengandung lesitin kacang kedelai siap pakai adalah Andromed®.

Andromed[®] merupakan diluter dengan kemasan siap pakai yang telah mengandung bahan krioprotektan berupa gliserol. Fruktosa sebagai substat energi utama yang terkandung dalam bahan dasar diluter Andromed[®] dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan (Arifiantini dkk, 2004).

1.4 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh bahan pengencer lesitin dengan berbagai konsentrasi yang berbeda terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa Ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing*.

1.5. Manfaat Hasil Penelitian

Memberi informasi kepada para peneliti lain maupun peternak ikan mengenai motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diberikan pengencer yang mengandung lesitin dengan konsentrasi yang berbeda.

1.6 Hipotesis

1. Bahan pengencer yang mengandung lesitin mampu mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing*
2. Konsentrasi yang tepat dalam bahan pengencer yang mengandung lesitin untuk dapat mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing* adalah sebesar 1:4

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

2.1.1 Taksonomi Ikan Mas

Ikan mas berasal dari benua Eropa dan masuk ke Indonesia pada tahun 1810. Ikan mas memiliki sifat adaptif terhadap lingkungan baru sehingga ikan mas dapat tersebar di seluruh penjuru dunia dengan berbagai strain (Tim Lentera,2002)

Dalam ilmu taksonomi hewan, klasifikasi ikan mas adalah sebagai berikut menurut Tim Lentera (2002) :

Phyllum	: Chordata
Subphyllum	: Vertebrata
Superclass	: Pisces
Class	: Osteichthyes
Sub class	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Sub ordo	:Cyprinoidea
Family	: Cyprinidae
Genus	: Cyprinus
Species	: <i>Cyprinus carpio</i>

2.1.2 Morfologi Ikan Mas

Karakteristik ikan mas yaitu memiliki tubuh memanjang dan memipih tegak (*compressed*) dengan mulut terletak di ujung tengah (*terminal*) dan dapat disembulkan (protaktil). Pada bagian anterior terdapat dua pasang sungut. Umumnya hampir seluruh tubuh ikan mas ditutupi oleh sisik yang berukuran

relatif besar dan digolongkan dalam sisik tipe sikloid. *Linea lateralis* (gurat sisi) terletak dipertengahan tubuh, melintang dari tutup insang sampai ke ujung belakang pangkal ekor (Suseno, 2000).

Menurut Cahyono (2002), ikan mas jantan dan betina dapat dibedakan melalui bentuk tubuhnya. Ikan mas jantan memiliki sirip dada panjang dan jari-jari luarnya tebal dengan lapisan dalam sirip dada kasar. Badan bagian perut tidak melebar dan tidak lunak. Ikan mas betina memiliki sirip dada pendek dan lunak. Badan bagian perut lebar (besar) dan lunak. Ikan betina memiliki tubuh lebih tebal bila dibandingkan dengan ikan mas jantan pada umur yang sama.

Menurut Djarijah (2001), ikan mas jantan memiliki sifat lebih cepat matang kelamin. Secara umum, ciri-ciri induk ikan mas jantan yang matang gonad adalah sebagai berikut : permukaan punggung dan sirip dada agak kasar; apabila permukaan perut dekat lubang kelamin di tekan maka akan mengeluarkan cairan kental berwarna putih; alat kelamin relatif kecil dan seolah-olah menyatu dengan lubang anus serta badannya langsing.



Gambar 2.1 Ikan Mas

(Sumber : Khairuman, 2002)

2.1.3 Reproduksi Ikan Mas

Reproduksi ikan umumnya dilakukan secara eksternal yaitu fertilisasi yang terjadi di luar tubuh ikan betina. Reproduksi ikan mas bersifat biseksual artinya perkembangan spermatozoa dan sel telur terjadi secara terpisah pada induk jantan dan betina. Organ reproduksi ikan disebut dengan gonad. Pada ikan betina memiliki gonad yaitu ovarium, sedangkan gonad ikan jantan disebut dengan testis (Rustidja,2000).

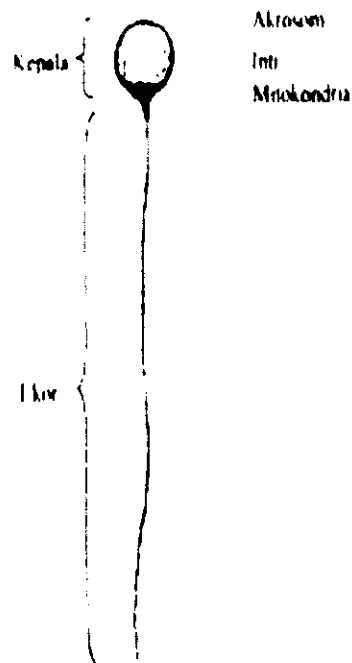
Ikan mas mencapai tingkat kedewasaan (matang gonad) pada umur 2-5 tahun dengan panjang tubuh berkisar 25-40 cm di daerah subtropis. Umumnya ikan jantan (2-3 tahun) lebih cepat matang gonad dibandingkan ikan betina (4-5 tahun). Di wilayah iklim tropis, ikan mas mencapai tingkat kedewasaan pada usia muda yaitu sekitar umur 1-2 tahun. Ikan mas akan memijah sepanjang tahun dan tidak dipengaruhi oleh musim (Tim Lentera,2002).

Ikan jantan memiliki organ reproduksi berupa testis yang merupakan tempat pembentukan spermatozoa. Testis ikan berbentuk memanjang dalam rongga badan di bawah gelembung renang di atas usus. Jaringan pengikat yang disebut *mesorchium* merupakan tempat menempelnya testis pada rongga badan di bagian depan gelembung renang. Struktur testis terdiri dari rongga-rongga yang tidak teratur dan banyak sekali (Nurmala,2008).

2.2 Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa ikan mas masih primitif yaitu terdiri dari kepala, bagian tengah, serta flagel (ekor). Kepala spermatozoa ikan mas berbentuk bulat dengan akrosom. Bentuk tersebut memungkinkan spermatozoa dapat bergerak. Pada bagian tengah spermatozoa terdapat mitokondria dan kompleks sentriol yang terdiri dari dua bagian yaitu distal dan proksimal (Islam, 2011).

Ukuran dan bentuk spermatozoa pada berbagai jenis hewan berbeda, namun struktur morfologinya sama. Rerata panjang kepala spermatozoa ikan hanya 2,0-4,0 μm dan ekornya dapat mempunyai panjang hingga 10 kali dari panjang kepalanya dan bisa mencapai 36 to 60 μm (Islam, 2011).



Gambar 2.2 Morfologi Spermatozoa Ikan (Sumber : Fujaya, 2004)

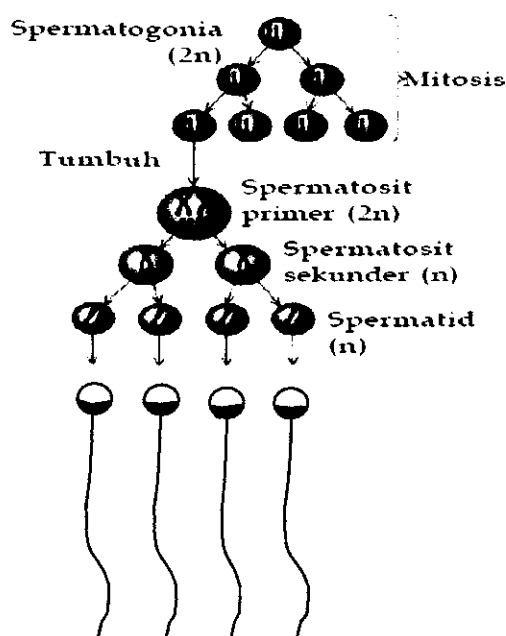
2.3 Perkembangan Spermatozoa

Perkembangan spermatozoa ikan mas secara umum sama dengan jenis ikan *Cyprinidae* lainnya yaitu terjadi di dalam testis. Perkembangan ini diawali dengan spermatogonium yang memperbanyak diri secara mitosis pada dinding tubuli dan testis. Spermatogonium berkembang menjadi spermatosit primer dan masing-masing spermatosit primer berkembang menjadi dua spermatosit sekunder, tiap-tiap spermatosit sekunder menghasilkan dua spermatozoa. Spermatozoa berkumpul dalam rongga tubulus dari testis. Pembelahan mitosis dimulai dari tahap pembentukan spermatosit primer sedangkan pembelahan meiosis dimulai dari tahap kromosom berpasangan, yang diikuti dengan duplikasi membentuk empat spermatid. Spermatid adalah calon sperma yang belum berekor. Spermatid yang telah mempunyai ekor disebut spermatozoa. Perubahan-perubahan ini meliputi pembentukan akrosom, kepala, leher dan ekor spermatozoa (Fujaya, 2004).

Proses spermiasi adalah pada akhir spermiogenesis dimana spermatozoa dilepaskan dari lumen lobulus dan masuk ke dalam saluran sperma. Hal ini terjadi akibat kenaikan tekanan hidrostatik di dalam kantung sperma sehingga spermatozoa terdorong keluar. Proses ini dipengaruhi oleh hormon yang disekresi oleh sel sertoli di bawah rangsangan gonadotropin. Spermatozoa didorong ke dalam sistem pengeluaran, di sini akan bercampur dengan plasma semen. Plasma semen yang dihasilkan dari dehidrasi testis, berwarna keputih-putihan dengan kekentalan yang tinggi, mengandung glukosa 5,70 mg/100ml, lipid 80,68

mg/100ml, plasma protein 0,13 mg/100ml serta urea 10,57 mg/100ml, pH 7,53 (Fujaya, 2004).

Spermatozoa immotil dalam lobul testicular dan mendapatkan motilitas setelah sperma saat bersentuhan dengan air, namun sebagian ikan lainnya mendapatkan motilitas pada saluran sperma. Immotilitas yg terjadi pada sperma dikarenakan oleh tingginya konsentrasi ion K^+ dalam cairan sperma. Ion ini dianggap sebagai faktor utama yg menghambat pergerakan sperma. Periode motil dari spermatozoa sangat pendek dan dipengaruhi oleh suhu air. Di dalam air payau spermatozoa bergerak sangat aktif hanya kira-kira setengah sampai satu menit. Konsentrasi spermatozoa ikan mas dalam 1 cm^3 bisa mencapai 10.000-20.000 juta sel, tergantung dari kepadatan spermatozoa (Woynarovich and Horvath, 1982 dalam Rustidja, 2004).



Gambar 2.3 Pola Perkembangan *Sexual Product* pada Ikan (Rustidja, 2004)

2.4 Lesitin

Lesitin merupakan nama lain untuk fosfatidilkolin yang merupakan suatu fosfolipid dalam komponen utama fraksi fosfatida yang dapat diisolasi dari kuning telur atau kacang kedelai yang diekstraksi baik secara mekanik maupun kimiawi. Lesitin yang terkandung dalam kedelai memiliki kadar fosfatidilkolin optimal (70-75%) serta mengandung asam lemak essensial. Lesitin pada bahan pengencer berperan untuk mengurangi pergerakan, melindungi spermatozoa terhadap suhu dingin (Aku dkk., 2007).

Lesitin yang umum digunakan adalah lesitin hewani, yaitu berasal dari kuning telur. Penggunaan lesitin hewani ini memiliki kekurangan yaitu kandungan kolesterolnya yang tinggi sehingga kurang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa sedangkan lesitin yang berasal dari kacang kedelai merupakan pilihan yang tepat untuk sumber lesitin pada bahan pengencer dimasa datang karena kandungan kolesterol yang rendah. Secara alamiah lesitin yang terkandung dalam kacang kedelai adalah sebanyak 1,48-3,08% dan pada telur 0,39% (Soyfoods center, 2005),

2.5 Pengencer Sperma

Prinsip pengenceran bertujuan untuk menambah volume dari setiap ejakulasi dan memberi zat-zat makanan yang dibutuhkan untuk mempertahankan daya tahan hidup dan fertilitas spermatozoa dan juga dapat memberi perlindungan terhadap spermatozoa dari terjadinya kejutan dingin (*cold shock*), mencegah

tumbuhnya kuman dan juga sebagai penyanggah dalam menjaga kestabilan pH (Toelihere, 1993 yang dikutip Mumu,2009).

Dewasa ini terdapat banyak pilihan pengencer komersial yang diproduksi oleh beberapa perusahaan dengan berbagai merek dagang. Bousseau *et al.* (1998) melaporkan bahwa pengencer komersial yang mengandung kuning telur seperti Biladyl[®], Bioiphos plus[®], Triadyl[®], sedangkan Laiciphos terkontaminasi oleh bakteri atau mycoplasma sebanyak 10–60 CFU/ml. Selanjutnya dinyatakan bahwa pengencer komersial yang tidak mengandung kuning telur seperti Biociphos plus dan AndroMed[®] yang tidak terkontaminasi bakteri. Pengencer komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah dikemas dalam bentuk paket siap pakai (Minitub,2001).

Komposisi kimia bahan pengencer AndroMed[®] tersusun dari beberapa bahan yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama proses pembekuan, diantaranya natrium dan kalium yang berperan dalam menjaga integritas fungsional membran plasma spermatozoa. Kalium juga berperan dalam menginduksi motilitas dan hiperaktivasi spermatozoa, serta dapat memengaruhi daya tahan hidup spermatozoa. Pengencer AndroMed[®] juga telah mengandung gliserol sehingga tidak perlu lagi ditambahkan senyawa krioprotektan (Minitub,2001).

2.6 Pembekuan Sperma

Pembekuan adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metabolisme berhenti mendekati total

yang disimpan pada suhu di bawah titik beku -79°C sampai -196°C (Hardijanto, 2010). Pada umumnya masalah pembekuan berkisar pada dua fenomena yaitu pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air, yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es. Pembekuan merupakan suatu fenomena pengeringan fisik. Pada proses pembekuan dimana terbentuk kristal-kristal es, terjadi penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel (Toelihere, 1993 yang dikutip Mumu, 2009).

2.7 Thawing

Menurut George *et al* (2010) bahwa *thawing* dilakukan dengan merendam sperma beku dengan air yang bersuhu 25°C selama 15 – 30 detik dengan posisi sumbat pabrik dibagian bawah atau horizontal sehingga seluruh bagian sperma beku terendam. Semakin cepat perubahan suhu *thawing* dapat mengurangi tekanan spermatozoa dan melewati masa tidak stabil (kritis) dengan cepat, sehingga spermatozoa hidup dan normal lebih banyak. Lama pencelupan pada air *thawing* yang pendek memberikan spermatozoa yang hidup lebih maksimal. Suhu dan lama *thawing* mempunyai pengaruh besar terhadap keadaan spermatozoa khususnya keutuhan spermatozoa. Kombinasi suhu dan lama *thawing* yang baik adalah yang mengakibatkan sedikit kerusakan spermatozoa, sehingga tetap memiliki kemampuan membuahi ovum yang tinggi

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang. Waktu penelitian mulai dari bulan Maret 2013 hingga bulan April 2013.

3.2 Bahan dan Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan satu ekor ikan mas jantan (*Cyprinus carpio*) dengan berat berkisar 0,7 kg yang diperoleh dari Balai Benih Ikan Mojokerto, diluter AndroMed®, Alkohol 70 %, larutan eosin negrosin, nitrogen cair dan aquabides.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop, *microtube*, gelas ukur, *mini straw*, *object glass*, *cover glass*, *erlenmeyer*, *thermometer*, *handly counter*, *alumunium foil*, kamar hitung *Improved Neubauer*, *cool top cabinet*, *container nitrogen cair*, *waterbath*, pinset, goblet, bunsen, ose, kertas pH, lap halus, pipet spuit dan lemari pendingin.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persipan penelitian

Persiapan penelitian meliputi sterilisasi alat serta persiapan bahan yang akan digunakan. Peralatan yang akan disterilisasi antara lain tabung reaksi, erlenmeyer dan spuit kemudin peralatan yang akan disterilisasi dicuci terlebih dahulu, dibilas dengan air dan dikeringkan kemudian pada bagian mulut tabung ditutup dengan *alumunium foil*. Sterilisasi alat-alat yang digunakan selama

penelitian dilakukan dengan cara sterilisasi kering dalam oven pada suhu 160-180°C selama 1-2 jam. (Zenichiro dkk.,2002).

Sampel yang disiapkan yaitu 1 ekor ikan mas jantan dengan umur minimal 10 bulan dan berat berkisar 0,75 kg. Kriteria ikan mas jantan yang baik adalah tidak cacat fisik, gerakan lincah dan tidak terserang penyakit (Suseno, 2000). Ciri ikan mas jantan yang telah matang gonad yaitu keluarnya cairan berwarna putih bila dilakukan *stripping* dari perut ke arah lubang urogenitalia (Cahyono, 2002).

3.3.2 Penampungan dan evaluasi sperma

Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang digunakan berasal dari Balai Besar Ikan Mojokerto. Teknik pengambilan sperma yaitu pertama-tama angkat ikan dari dalam air, kemudian dipegang dengan menggunakan kain dengan lubang genitalia menghadap ke atas, bersihkan dan keringkan bagian lubang genitalia dari tetesan air, ikan kemudian *distripping* dengan mengurut perut mulai dari perut ke arah lubang urogenital secara perlahan dan tampung ke dalam tabung semen. Menurut Susilowati (2010), hasil yang ditampung pada tabung reaksi kemudian dilakukan pemeriksaan sperma segar untuk mengetahuinya dilakukan pemeriksaan makroskopis meliputi uji volume, konsistensi sperma, warna dan derajat keasaman sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi :

- Motilitas dapat dibedakan menjadi arah gerakan dan kecepatan gerakan individu. Penilaian arah gerakan adalah sebagai berikut :
 - Progresif (P) : Gerakan maju ke depan
 - Oscilatory (O) : Gerakan bergetar
 - Circular (C) : Gerakan melingkar

- Reverse (R) : Gerakan mundur
- Necropermia (N) : Tidak ada gerakan

Motilitas atau arah gerakan spermatozoa dinyatakan dalam persen dan kecepatan pergerakannya dinyatakan dengan angka. Penentuannya berdasarkan atas perbandingan spermatozoa yang bergerak aktif maju ke depan (progresif) dan spermatozoa yang tidak bergerak

- Gerakan massa : diperiksa dengan meneteskan satu tetes sperma segar ke obyek gelas yang bersih dan hangat lalu diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. Kriteria penilaian :
 - +++ (3), gerakan massa yang paling baik yang ditandai dengan gelombang besar, banyak, bergerak cepat dan berpindah-pindah tempat
 - ++ (2), gerakan massa yang baik ditandai dengan gelombang besar, tipis, jarang dan bergerak lambat
 - + (1), gerakan massa yang kurang baik ditandai dengan adanya gelombang tipis dan sedikit jumlahnya.

Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan alat yaitu *spectrofotometer*, dengan papan hitung Improved neubauer atau cara Thoma. Cara Improved neubauer dengan memakai *haemositometer* : dilakukan pengenceran untuk sekaligus membunuh spermatozoa dengan larutan NaCl 3 % yang mengandung eosin (Susilowati dkk.,2010).

3.3.3 Perlakuan pembuatan diluter AndroMed®

Pengencer AndroMed® dapat langsung digunakan karena sudah tersedia di pasaran. Selama ini pengencer Andromed® yang mengandung lesitin digunakan untuk pengenceran semen sapi atau domba dengan perbandingan 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 4 bagian aquabides, akan tetapi perbandingan tersebut belum tentu memberikan hasil yang baik bagi sperma beku ikan sehingga pada penelitian ini dicoba untuk membuat konsentrasi bahan pengencer yang mengandung lesitin agar dapat mempertahankan kualitas sperma tersebut (Arifiantini dkk., 2004). Pengencer Andromed® yang telah tersedia disiapkan dan dicampur dengan aquabides dengan masing-masing perbandingan 1:2, 1:4 dan 1:8. Sperma yang sudah diketahui konsentrasi kemudian dicampur dengan diluter AndroMed® yang sudah diencerkan dengan berbagai konsentrasi yang berbeda secara perlahan melalui dinding tabung elenmeyer. Proses yang dilakukan selanjutnya adalah memasukkan ke dalam *cool top* hingga mencapai suhu 3-5°C.

Tabel 3.1 Rancangan Percobaan

AndroMed® Ulangan	P 1 1:2	P 2 1:4	P 3 1:8
1	P 1.1	P 2.1	P 3.1
2	P 1.2	P 2.2	P 3.2
3	P 1.3	P 2.3	P 3.3
4	P 1.4	P 2.4	P 3.4
5	P 1.5	P 2.5	P 3.5
6	P 1.6	P 2.6	P 3.6

Perlakuan yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- P 1 : Spermatozoa ikan dengan diluter AndroMed® 1: 2 (AndroMed® 5 ml, aquabides 10 ml)
- P 2 : Spermatozoa ikan dengan diluter AndroMed® 1: 4 (AndroMed® 3 ml, aquabides 12 ml)
- P 3 : Spermatozoa ikan dengan diluter AndroMed® 1: 8 (AndroMed® 2 ml, aquabides 16 ml)

3.3.4 Pembuatan Sperma Beku

Proses pembuatan semen beku terdapat pada Lampiran 1 yang meliputi *equilibrasi* dilakukan pada suhu 3-5°C selama kurang lebih 1 jam. Tahap evaluasi sebelum pembekuan dilakukan pemeriksaan kualitas spermatozoa meliputi motilitas dan viabilitas dan diolah dalam analisis data kemudian dilanjutkan dengan melakukan *prefreezing* dan *freezing* secara bertahap. Proses setelah dilakukan pembekuan adalah di *thawing* (dicairkan) kembali. Suhu dan lama *thawing* mempunyai pengaruh besar terhadap keadaan spermatozoa. Menurut George *et al.* (2010), *thawing* dilakukan dengan merendam sperma beku pada air yang bersuhu 20°C - 25°C selama 30 detik dengan posisi sumbat pabrik dibagian bawah atau horizontal sehingga seluruh bagian sperma beku terendam dan kemudian dilakukan evaluasi ulang setelah pembekuan dengan menghitung motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*).

3.3.5 Pemeriksaan *Post Thawing*

a. Motilitas Individu Spermatozoa (*Post Thawing Motility*)

Pemeriksaan *post thawing motility* atau pencairan kembali setelah pembekuan dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 x untuk melihat berapa besar persentase motilitas progressif dan kecepatan gerak individunya. Sperma beku yang diperiksa terlebih dahulu yaitu dimasukkan ke dalam *water bath* yang bersuhu 25°C selama 15 – 30 detik (George *et al.*, 2010).

Perhitungan untuk menentukan persentase *post thawing motility* :

$$\% \text{ Motilitas Spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa progresif}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

b. Viabilitas Spermatozoa

Jumlah spermatozoa yang hidup dihitung dengan cara meneteskan sperma di dalam *straw* yang sudah di cairkan dengan air $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik dan ditetaskan pada objek glass yang bersih lalu dicampur dengan zat warna Eosin-Negrosin kemudian dibuat preparat ulas dengan cara slide dan kemudian difiksasi diatas api (maksimal 15 detik). Pengamatan dilakukan atas spermatozoa yang hidup dan mati dengan perbesaran 400 kali (George *et al.*, 2010).

Guna menentukan persentase spermatozoa yang hidup dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Viabilitas Spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

3.4 Variabel Penelitian

- Variabel bebas : AndroMed® dalam tiga macam konsentrasi yang berbeda
- Variabel terikat : Kualitas spermatozoa meliputi persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah pembekuan
- Variabel terkendali : Jenis kelamin, umur, kondisi fisik hewan, suhu ruang penelitian dan pembekuan, lama proses pembekuan

3.5 Identifikasi Operasional Variabel

3.5.1 Motilitas Spermatozoa

Motilitas adalah arah gerakan dan kecepatan spermatozoa. Pada umumnya yang terbaik adalah pola pergerakan progresif atau gerakan aktif maju ke depan merupakan gerakan terbaik. Gerakan melingkar atau gerakan mundur merupakan tanda *cold shock* atau media yang kurang isotonik terhadap sperma. Gerakan berayun dan berputar-putar di tempat biasanya terlihat pada sperma yang sudah tua dan apabila kebanyakan spermatozoa berhenti bergerak dan dianggap mati (Feradis, 2010).

3.5.2 Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa didapat dari pengamatan struktur spermatozoa pada daerah kepala, bila berwarna transparan berarti spermatozoa masih hidup dan yang mati pada daerah kepala berwarna, sehingga didapatkan data dalam bentuk persentase. Penyerapan warna dipengaruhi oleh kondisi membran spermatozoa yang apabila fungsi permeabilitas tidak berfungsi, maka pewarna bisa masuk

tanpa terkontrol, sedangkan bila membran bagus spermatozoa tidak dapat menyerap warna sehingga tampak transparan (Hardijanto,2010).

3.6 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan enam ulangan. Penentuan ulangan berdasarkan rumus: $t(n-1) \geq 15$ dengan $t = 3$ adalah perlakuan sehingga diperoleh hasil ulangan(n) sebanyak :

$$t(n-1) \geq 15 \implies 3(n-1) \geq 15$$

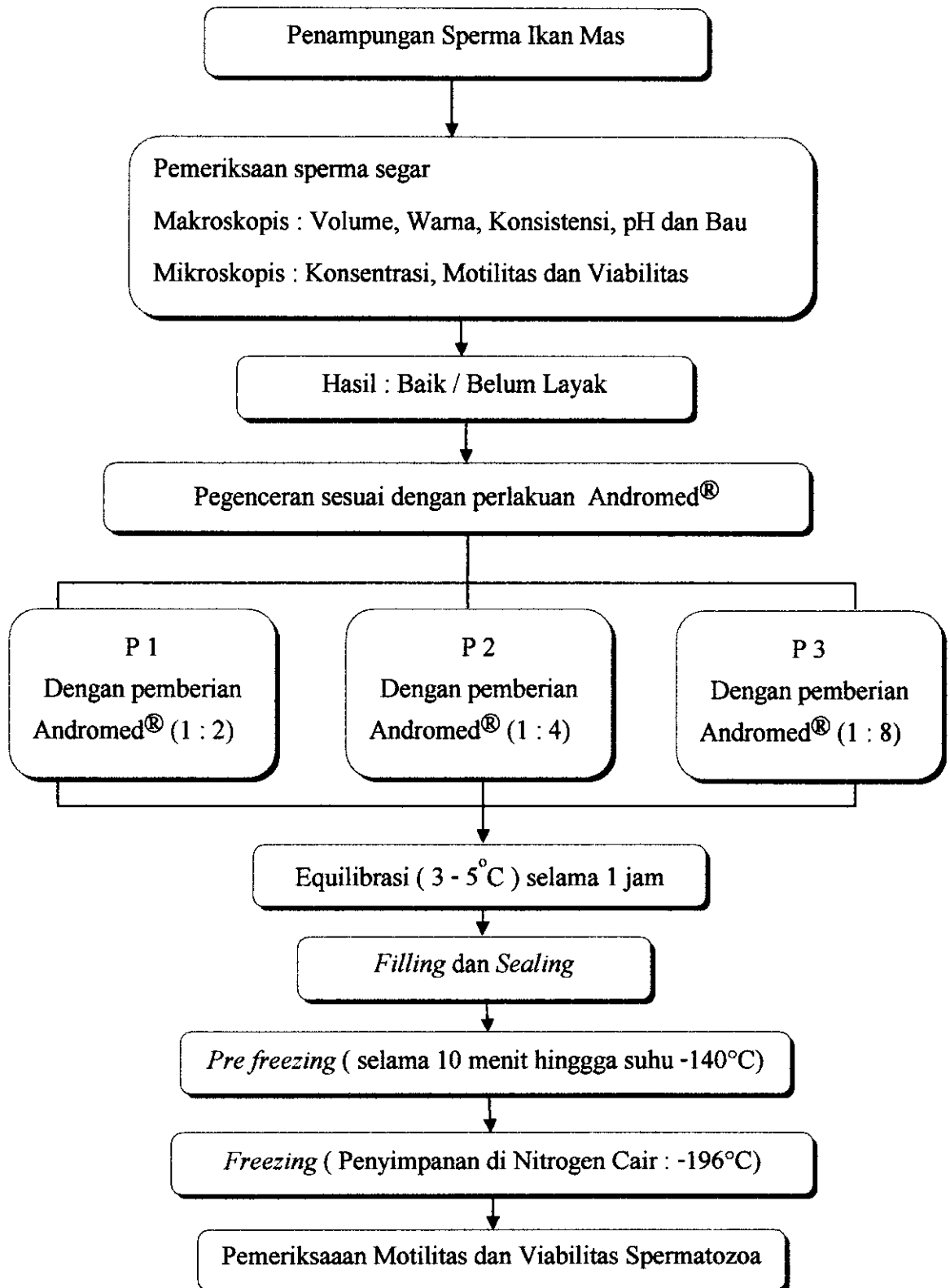
$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18 \quad \text{sehingga diperoleh} \quad \boxed{n = 6}$$

3.7 Analisis Data

Data dianalisa dengan menggunakan uji *Analysis of Variant* (ANOVA) Jika hasil uji ANOVA menunjukkan pengaruh yang signifikan, selanjutnya dilakukan uji lanjut Uji Jarak Berganda Duncan untuk membandingkan antar perlakuan tersebut (Kusriningrum, 2011).

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Prosedur Penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Keadaan Spermatozoa Segar

Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) sebelum diberi perlakuan, terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui spermaozoa layak atau tidak diproses lebih lanjut. Kualitas spermaozoa segar sangat penting untuk menentukan kelayakan spermatozoa pada proses pembekuan. Pada penelitian ini, penentuan kelayakan spermatozoa pada sperma segar ikan mas yang dilakukan adalah pemeriksaan mikroskopis dan makroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan derajat keasaman (pH), sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas dan viabilitas. Hasil evaluasi spermatozoa pada spermatozoa segar selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Pemeriksaan Spermaozoa Segar Ikan Mas

No	Parameter	Hasil Pemeriksaan
1.	Warna	Putih Susu
2.	Bau	Khas (Tidak berbau busuk)
3.	Volume	1,7 ml
4.	Konsistensi	Kental
5.	pH	7,2
6.	Konsentrasi	$6,0156 \times 10^9$ sel/ ml
7.	Motilitas	80%
8.	Gerakan Massa	+++
9.	Viabilitas	87,37%

4.2 Pemeriksaan Persentase Motilitas *Post Thawing*

Data persentase motilitas progresif spermatozoa *post thawing* setelah diberi tiga perlakuan dengan berbagai macam konsentrasi pengencer dan enam kali ulangan yang tercantum dalam Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas Progresif *Post Thawing*

Perlakuan	Motilitas Spermatozoa (%) (Rerata $\pm$ Standar Deviasi)
P1	17,17 ^b $\pm$ 3,763
P2	21,67 ^a $\pm$ 2,422
P3	9,50 ^c $\pm$ 1,516

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$)

Keterangan:

P1 (1:2) = 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 2 bagian aquabides

P2 (1:4) = 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 4 bagian aquabides

P2 (1:8) = 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 8 bagian aquabides

Berdasarkan analisis statistik dengan menggunakan Anova terhadap rata-rata persentase motilitas progresif spermatozoa *post thawing* menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$) antara ketiga kelompok tersebut karena memiliki perbedaan konsentrasi bahan pengencer yang mengandung lesitin di antara masing-masing perlakuan.

4.3 Pemeriksaan Persentase Viabilitas *Post Thawing*

Data persentase viabilitas spermatozoa *post thawing* setelah diberi tiga perlakuan dengan berbagai macam konsentrasi pengencer dan enam kali ulangan yang tercantum dalam Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Rerata dan Standar Deviasi Persentase Viabilitas *Post Thawing*

Perlakuan	Viabilitas Spermatozoa (%) (Rerata $\pm$ Standar Deviasi)
P1	21,50 ^a $\pm$ 3,728
P2	23,67 ^a $\pm$ 2,875
P3	12,67 ^b $\pm$ 4,546

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Keterangan:

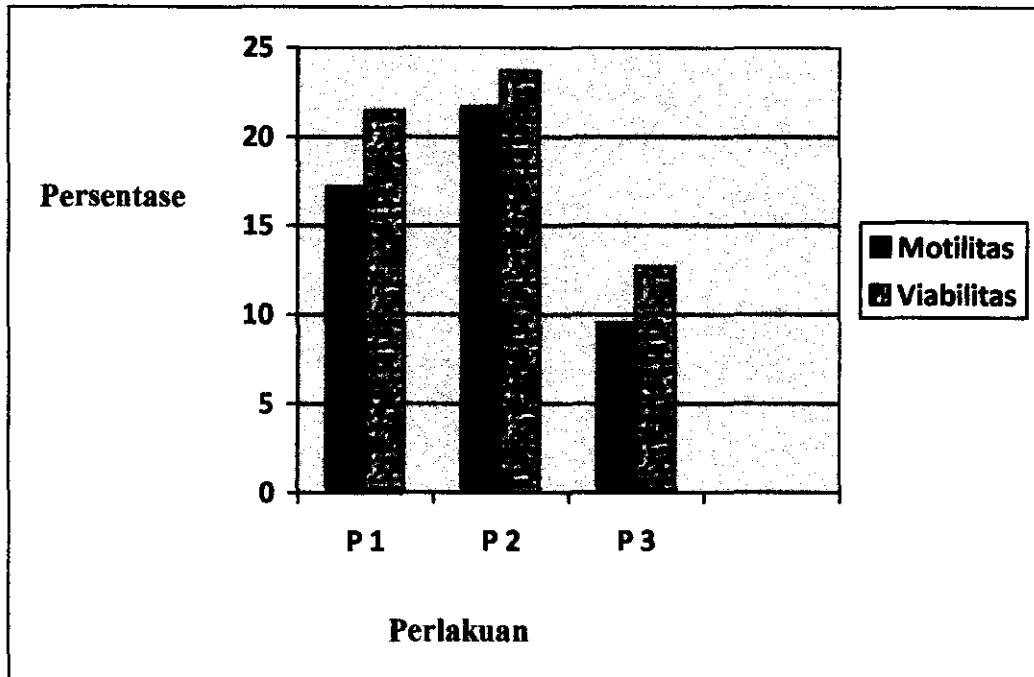
P1 (1:2) = 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 2 bagian aquabides

P2 (1:4) = 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 4 bagian aquabides

P2 (1:8) = 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 8 bagian aquabides

Menurut analisis data statistik dengan menggunakan Anova terhadap rata-rata persentase motilitas progresif spermatozoa *post thawing* P1 tidak berbeda nyata dengan P2 tetapi menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap P3 karena terdapat perbedaan konsentrasi pengencer yang berbeda antar perlakuan.

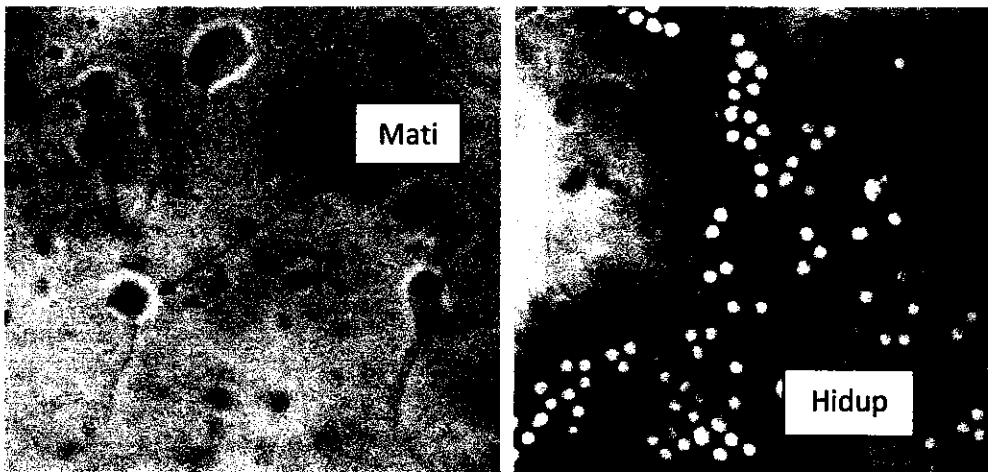
Berdasarkan tabel di atas , diagram batang rerata persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 4.1 Grafik Persentase Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa *Post Thawing*

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa perlakuan P2 memiliki kualitas tertinggi baik nilai persentase motilitas dan viabilitas dengan rata-rata persentase 21,67 % dan 23,67%. Hasil terendah diperoleh perlakuan P3 dengan nilai persentase rata-rata motilitas 9,50% dan viabilitas 12,67 %.

Gambaran spermatozoa hidup dan yang mati dapat dilihat pada Gambar 4.2 yang telah diwarnai dengan Eosin-negrosin.



Gambar 4.2 Pemeriksaan Mikroskopis Hidup-Mati Spermatozoa dengan Perbesaran 400 kali dan Zoom In 40%

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1 Evaluasi Kualitas Spermatozoa Segar

Berdasarkan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis yang disajikan pada Tabel 4.1 spermatozoa ikan mas tersebut layak untuk diproses lebih lanjut untuk keperluan pengenceran dan penyimpanan. Kualitas dan kuantitas awal spermatozoa sangatlah penting untuk diketahui guna menentukan kelayakan untuk proses lebih lanjut. Berdasarkan hasil pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis spermatozoa segar ikan mas pada Tabel 4.1 terlihat bahwa volume yang didapatkan sebanyak 1,7 ml normalnya menurut Rustidja (2000) 1,5-2,7 ml, pH 7,2 (netral), warna putih susu, kekentalan juga bagus (seperti santan). Motilitas spermatozoa tertinggi yaitu 80%. Hal ini sesuai dengan yang dipersyaratkan dalam Rustidja (2000) bahwa spermatozoa segar yang akan digunakan untuk penyimpanan dan pembekuan harus mempunyai motilitas minimal 70%.

Rata-rata konsentrasi spermatozoa yang dihasilkan adalah $6,0156 \times 10^9$ sel/ml. Perhitungan konsentrasi yang dilakukan dengan menggunakan kamar hitung *Improved Neubauer* dan jumlah sel spermatozoa yang didapat dalam 16 kotak kecil x 5 kotak besar adalah sebanyak 385 sel, dimana dalam perhitungan jumlah yang digunakan sesuai dengan Susilowati dkk (2010) di dalam 1 mm^3 spermatozoa ada $15625 \times Y = 15625 \times 385 \text{ sel} = 6,0156 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$ maka jika dikonversikan dalam satuan mililiter akan menjadi $6,0156 \times 10^9 \text{ sel/ml}$. Konsentrasi tersebut ternyata tidak sesuai dengan informasi Zairin *et*

al. (2005) bahwa konsentrasi spermatozoa ikan Cyprinidae berkisar antara $7,6 - 28 \times 10^9$ tergantung dari kekentalannya. Motilitas progresif pemeriksaan mikroskopis untuk gerakan massa menunjukkan +++ dimana pergerakannya adalah bergelombang dan padat, membentuk pusaran-pusaran gelombang hal ini sesuai dengan Fujaya (2004).

Pencampuran dengan bahan pengencer dilakukan dengan perbandingan 1:20 sesuai dengan Yulianty dkk (2011) yang menyebutkan bahwa perlakuan pengenceran ini memiliki tingkat fertilisasi lebih tinggi. Pengenceran spermatozoa dilakukan sesuai dengan perlakuan berbagai macam konsentrasi Andromed[®] yang berbeda-beda pada suhu ruang atau suhu kamar. Tahapan berikutnya yang dilakukan adalah tahap equilibrasi dengan suhu $3-5^{\circ}\text{C}$ serta *filling* dan *sealing* pada suhu yang sama dan dilanjutkan dengan proses *prefreezing* dan *freezing* pada masing-masing suhu yang berbeda. Pemeriksaan kualitas spermatozoa pada *post thawing* dilakukan pada air dengan suhu *thawing* 25°C selama 30-60 detik di bawah mikroskopis untuk melihat pergerakan motilitasnya dan pembuatan preparat ulas untuk pemeriksaan viabilitas spermatozoa (George, 2010).

5.2 Evaluasi Kualitas

5.2.1. Motilitas Spermatozoa

Motilitas atau daya gerak spermatozoa digunakan sebagai ukuran kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Motilitas yang didapatkan pada penelitian kali ini adalah 80%. Motilitas tersebut masih dalam kisaran normal sebab menurut Rustidja (2000) motilitas minimum spermatozoa dalam spermatozoa segar yang akan digunakan dalam proses pembekuan adalah 70%.

Dengan demikian, spermatozoa dalam sperma segar ikan mas yang akan digunakan dalam penelitian dinyatakan layak.

Motilitas spermatozoa *before freezing* pada P1, P2, P3 pada penelitian ini adalah 59, 65, 55%. Nilai tersebut telah sesuai dengan syarat motilitas minimum (55%) spermatozoa *before freezing*. Penelitian ini menunjukkan motilitas progresif spermatozoa tertinggi (21,67%) didapatkan pada perlakuan P2 dengan 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 4 bagian aquabidest sedangkan motilitas spermatozoa terendah (9,50%) didapatkan pada perlakuan P3 dengan 1 bagian pengencer yang mengandung lesitin : 8 bagian aquabidest sehingga menimbulkan bahan pengencer yang digunakan semakin sedikit jumlah makanan bagi spermatozoa untuk bertahan hidup.

Penurunan drastis motilitas spermatozoa *post thawing* ini mungkin dikarenakan oleh karena ikan mas yang digunakan masih berumur 10 bulan sedangkan pada daerah tropis umur ikan mas yang matang gonad bisa mencapai 1-3 tahun dengan berat badan antara 1-2,5 kg sehingga banyak spermatozoa muda yang dikeluarkan pada saat *stripping*. Proses *stripping* yang merupakan pemijahan buatan ini belum tentu semua spermatozoa yang dihasilkan mempunyai kemampuan dalam proses fertilisasi karena spermatozoa dihasilkan masih dalam tahap proses pematangan (*maturation*).

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa *post thawing* menunjukkan perbedaan yang sangat nyata diantara ketiga macam perlakuan tersebut disebabkan karena adanya perbedaan masing-masing konsentrasi bahan pengencer yang digunakan berkorelasi terhadap kualitas spermatozoa khususnya persentase

motilitasnya. Nilai motilitas dari penelitian ini masih rendah karena hasil yang tertinggi diperoleh dari P2 hanya sebesar 21,67%, sedangkan pada penelitian dalam bahan pengencer lain (kuning telur sitrat) dapat mencapai 45,83% persentase motilitasnya (Sultana *et al.*, 2010).

Hal ini dimungkinkan karena komposisi organik *milt* (seminal plasma) dari *carp* mempunyai energi substrat seperti glukosa dan fruktosa, laktase, piruvat, malat dan bahan yang lainnya dalam jumlah yang kecil pada spermatozoa. Berdasarkan tipe spermatozoa tersebut menyebabkan adanya beberapa perbedaan susunan kimia yang terkandung didalamnya. Haurbruge *et al.*, (2000) mengatakan bahwa ikan *carp* mempunyai biokimia spermatozoa dan proses spermatogenesis yang berbeda yaitu pada sperma *carp* dapat dengan mudah dikeluarkan dengan cara di *stripping*.

P1 menunjukkan bahwa persentase motilitas progresif yang lebih rendah dari P2 karena komposisi bahan pengencer Andromed[®] yang mengandung lesitin dibuat lebih besar dibandingkan dengan pelarutnya aquabides sehingga menyebabkan konsentrasinya lebih pekat. Walaupun energi spermatozoa dapat terpenuhi tetapi asam laktat sisa metabolisme spermatozoa juga dapat menumpuk dan memenuhi bahan pengencer akibatnya dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa.

P2 menunjukkan bahwa motilitas progresifnya lebih besar dan paling tinggi karena pada bahan pengencer Andromed[®] yang mengandung lesitin telah digunakan konsentrasi yang tepat sesuai anjuran dalam kemasan yang terdapat di

label tersebut sehingga komposisi yang ada dalam bahan pengencer tersebut telah memenuhi standar sebagai sumber energi utama bagi spermatozoa.

P3 menunjukkan bahwa persentase motilitas lebih rendah dibandingkan P1 dan P2, hal ini mungkin terjadi karena perbandingan antara aquabides sebagai pelarut lebih besar dibandingkan dengan bahan pengencer Andromed® yang menyebabkan pengencer mempunyai konsentrasi lebih encer bagi spermatozoa, akibatnya sebagian besar bahan-bahan yang terkandung dalam Andromed® larut dalam aquabides sehingga sumber energi terutama fruktosa yang dibutuhkan spermatozoa yang terkandung dalam Andromed® menjadi sedikit.

Sesuai pendapat Mar'ati (2007) menjelaskan bahwa proses adaptasi sel spermatozoa terhadap konsentrasi bahan pengencer dapat mengakibatkan gangguan permeabilitas membran, menurunkan aktivitas metabolisme, kerusakan sel dan dapat menurunkan motilitas, selanjutnya pendapat dalam Sulmartiwi *et al.* (2011) menambahkan bahwa metabolisme spermatozoa menyebabkan cadangan makanan berkurang dan elektrolit larutan menjadi tidak seimbang sehingga spermatozoa akan mengalami penurunan kualitas.

5.2.2. Viabilitas Spermatozoa

Pemeriksaan persentase spermatozoa hidup dan mati dari sediaan ulas yang menggunakan zat warna eosin negrosin. Spermatozoa yang tidak menyerap warna eosin negrosin menyatakan jumlah yang hidup dan spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya meningkat sehingga akan menyerap warna eosin negrosin. Spermatozoa yang hidup mempunyai kondisi membran baik sehingga

zat warna kesulitan dalam menembus membran, akibatnya spermatozoa tetap berwarna jernih (Susilowati dkk.,2010).

Data hasil persentase hidup spermatozoa pada tiap kelompok perlakuan menunjukkan angka rata-rata persentase hidup dan simpangan baku berturut-turut adalah sebesar P1 sebesar $21,50 \pm 3,728$, P2 sebesar $23,67 \pm 2,875$ dan P3 sebesar $12,67 \pm 4,546$ dimana P1 tidak berbeda nyata dengan P2 tetapi menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap P3 karena terdapat perbedaan konsentrasi bahan pengencer Andromed[®] yang mengandung lesitin setiap perlakuan.

P1 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan P2 dimana hasil persentase yang dihasilkan tidak jauh berbeda, hal ini mungkin dapat terjadi karena komposisi yang terkandung dalam bahan pengencer Andromed[®] mampu menyediakan bahan makanan bagi spermatozoa baik *prefreezing* maupun saat *freezing* sehingga setelah *freezing* dapat mempertahankan dan menjaga kualitas spermatozoa ikan mas.

Pada pengencer yang mengandung lesitin nabati (Andromed[®]) mengandung komposisi tris hydroxyl aminomethan, buffers dan asam sitrat. Buffer berfungsi sebagai penyanggah untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa. Proses respirasi pada metabolisme spermatozoa menghasilkan asam laktat. Asam laktat berpengaruh menurunkan kehidupan dan motilitas spermatozoa dimana tingkatan asam laktat berkorelasi nyata dengan daya gerak spermatozoa dan asam laktat dapat memperpendek daya tahan hidup spermatozoa.

P2 menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa lebih tinggi (23,67%) dibandingkan lainnya, hal ini terjadi karena perbandingan antara aquabides dengan pengencer Andromed[®] tepat sehingga bahan-bahan yang terdapat dalam Andromed[®] dapat memenuhi sumber energi bagi spermatozoa terutama fruktosa sebagai substrat energi utama bagi spermatozoa. Sedangkan pada P3 menunjukkan hasil terendah (12,67%) disebabkan karena bahan pengencer tersebut terlalu encer bagi spermatozoa, akibatnya bahan-bahan yang terkandung dalam Andromed[®] seperti lesitin yang berfungsi sebagai pelindung spermatozoa menjadi terbatas sehingga kurang mampu memberikan perlindungan dengan baik. Selain itu proses pencampuran pada pengencer Andromed[®] dilakukan satu tahap, sehingga kontak spermatozoa dengan gliserol lebih lama dibandingkan pengencer yang dilakukan pencampuran dua kali tahap. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Maxwell (1995) yang menyatakan bahwa gliserol dapat memberikan perlindungan terhadap *cold shock* tetapi dapat menyebabkan kerusakan pada struktur spermatozoa selama proses pembekuan. Perlindungan efektif diperoleh setelah kontak yang singkat dengan spermatozoa, hal ini terjadi karena fungsi gliserol sebagai krioprotektan juga dapat bersifat racun.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Bahan pengencer yang mengandung lesitin mampu mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing* dengan persentase motilitas sebesar 21,67% dan viabilitas sebesar 23,67%.
2. Konsentrasi dalam bahan pengencer yang mengandung lesitin terbaik dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing* adalah sebesar 1:4.

6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan setelah dilakukan penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan standardisasi persentase *post thawing motility* pada spermatozoa ikan.
2. Penelitian lebih lanjut untuk pembekuan spermatozoa ikan dengan berbagai macam pengencer.

RINGKASAN

RINGKASAN

Dinar Rumondang Siahaan. Pengaruh bahan pengencer yang mengandung lesitin terhadap kualitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing* dengan Prof. Mas'ud Hariadi, drh., M.Phil., Ph.D selaku pembimbing utana dan Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes selaku dosen pembimbing serta.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh bahan pengencer lesitin dengan berbagai konsentrasi yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa Ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing*. Konsentrasi bahan pengencer yang digunakan dalam penelitian ini ada berbagai macam diantaranya yaitu Andromed[®] dengan pengencer aquabides 1:2 (P1), 1:4 (P2) dan 1:8 (P3). Penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dengan 6 kali ulangan untuk masing-masing perlakuan. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Anova dan untuk mengetahui hubungan antara motilitas dan viabilitas dilanjutkan dengan uji lanjut Uji Jarak Berganda Duncan untuk membandingkan antar perlakuan tersebut.

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari. Sampel dalam penelitian ini adalah sperma ikan mas jantan produktif (matang gonad) sebagai penghasil spermatozoa yang ada di Balai Benih Ikan Mojokerto. Sampel yang digunakan adalah seekor ikan mas jantan dengan berat 0,7 kg dan panjang badan 30 – 35 cm. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi bahan pengencer Andromed[®] yang mengandung lesitin P1 = 1:2; P2

=1:4; P3=1:8. Variabel terikat adalah motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) *post thawing*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Andromed® dengan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap persentase motilitas dan viabilitas. Rata-rata persentase tertinggi diperoleh perlakuan P2 sebesar 21,67 % untuk motilitas dan 23,67 % untuk persentase viabilitasnya, sedangkan nilai terendah diperoleh P3 sebesar 9,50% untuk motilitasnya dan 12,67% untuk viabilitasnya.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa pada pengencer lesitin dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh nyata terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*). Konsentrasi 1 bagian pengencer lesitin : 4 bagian aquabides (P2) merupakan konsentrasi tertinggi dalam motilitas (21,67%) dan viabilitas (23,67%) spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*) *post thawing*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla E.M.E and T. Terada. 2004. Effects of Supplementation of Trehalosa Extender Containing Egg Yolk with Sodium Dodecyl Sulfate on the fFreezability of Goat Spermatozoa. *Theriogenology* 62: 809-818.
- Aku, A.S., T. Saili., M. Rizial., Heradis, B. Purwantara and M.R. Toelihere. 2007. Cryopreservation of Garut Ram Semen Using Lesitin Based Ekstender, In *Proccedings International Asia Link Symposium reproductive Biotechnology for Improvig Animal Breeding in Southeast Asia*. Bali. August. Pp. 175-177.
- Arifiantini. I.S dan T.L.Yusuf. 2004. Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi Friesian Holstein. [30 MEI 2010].
- Bousseau, S., J.P. Brilliard, B. Guienne, A. Camus and M. Lechat. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706.
- Billard R., J. Cosson, G. Perchee and. O. Linhart. 1995. Biology of Sperm and Artificial Reproduction in Carp. *Aquaculture* 129: 95-112.
- Cabrita E, V. Robles, and P .Herraez. 2008. *Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*. CRC Press. Boca Raton. New York.
- Cahyono, B. 2002. *Budidaya Ikan Air Tawar*. Kanisius. Yogyakarta. Hal 113.
- Djarajah. A, S. 2001. *Pembenihan Ikan Mas*. Kanisius. Yogyakarta.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi Ternak*. Alfabeta. Bandung.
- Fujaya, Y. 2004. *Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan*. Rineka Cipta. Jakarta. hal: 151-158
- Gazali, M. dan S. N. Tambing. 2002. Cryopreservation of Sperm. *Jurnal Hayati*. 9 :6

- George. S.Y., L.Rodriguez., T.Fujimoto and K. Arai. 2010. A Sperm Cryopreservation Protocol for the Loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its Applicability for other Related Species. Hokkaido University. Japan.
- Hafez ,E.S.E and B. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animal, 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. South Carolina. USA. p:347-441.
- Hardijanto, T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati, dan T.W. Suprayogi. 2010 . Buku Ajar Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (Inseminasi Buatan). Airlangga University Press. Surabaya.
- Haubruge E, F Petit and M Gage. 2000. Reduced Sperm Counts in Guppies (*Poecilia reticulata*) Following Exposure to Low Levels Oftributyltin and Bisphenol. *Proc. R. Soc. Biol. Ser. B*.267: 2333 -2337
- Hidayaturrahmah. 2007. Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) pada beberapa konsentrasi larutan Fruktosa. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.Universitas Lambung Mangkurat.
- Islam, S. 2011. Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. Department of Fisheries Biology & Genetics, Bangladesh Agricultural University
- Khairuman. 2002. Budidaya Ikan Mas secara Intensif. P. T. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Khairuman, S. P., D. Sudenda dan B. Gunandi. 2008. Budidaya Ikan mas secara intensif.Agromedia Pustaka. Jakarta. hal 100.
- Kusriningrum, R.S. 2011. Buku Ajar Perancangan Percobaan. Cetakan kedua. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penerbit Dani Abadi. Surabaya.
- Madyawati, S.P. 2007. Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi terhadap Kualitas Semen Beku. [Disertasi]. Universitas Airlangga. Surabaya
- Mar'ati, K. 2007. Pengaruh Dosis dan Lama Penyimpanan Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang, Malang, 41 hlm.
- Minitub. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfullund Labortechnik GmbH &Co KG. Germany.

- Maxwell WMC, S.Salamon. 1995. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 29-46
- Mumu, I. M. 2009. Viabilitas semen sapi Simmental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. *J. Agroland*. 16 (2): 172-179. Fakultas Pertanian. Universitas Tadulako.
- Nurmala, S. 2008. Pengaruh suhu dan lama thawing terhadap kualitas spermatozoa sapi Fries holland [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Malang.
- Rustidja. 2000. Prospek Pembekuan Sperma Ikan. Fakultas Perikanan Brawijaya Malang.
- Rustidja. 2004. Pemijahan Buatan Ikan-Ikan Daerah Tropis. Bahtera Press. Malang. hal 19.
- Soyfoods Center. 2005. History of Soy Lecithin. In : The World's Leading Source of Information on Soyfood. [www.the soy daily™](http://www.the-soy-daily.com). 1-2
- Sulmartiwi, L., E. Ainurrohman, dan A. Shofy Mubarak. 2011. Pengaruh Konsentrasi Air Kelapa Muda dan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Motilitas dan Lama Hidup Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, Vol. 3 No. 1
- Surachman, M., M.A. Herdis, Setiadi dan M. Rizal. 2006. Kriopreservasi Spermatozoa Epididimis Domba Menggunakan Pengencer Berbasis Lesitin. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Sultana, M., M. Nahiduzzaman., M. M. Hasan. 2010. *Fertility of cryopreserved common carp (Cyprinus carpio) spermatozoa*. Department of Fisheries Biology and Genetics. Bangladesh Agricultural University
- Suseno, D. 2000. Pengelolaan Usaha Pembenihan Ikan Mas. Penebar Swadaya. Jakarta. hal 54.
- Susilowati. S., Hardijanto, T.W. Suprayogi., T.Sardjito., T. Hernawati. 2010 . Penuntun Pratikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (Inseminasi Buatan). Airlangga University Press. Surabaya.
- Tim Lentera. 2002. Pembesaran Ikan Mas di kolam air deras. PT. Agromedia Pustaka. Jakarta. hal 96.
- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Penerbit Angkasa

- Woynarovich, E and L. Horvath. 1982. The artificial Propagation of Warm WaterFin-Fish. A Manual Extension. FAO Technical paper no.21. FAO Rome. p. 182
- Yulianty, A., H. Singal dan J. Watung.2011. Ratio Pengenceran terhadap Motilitas, Fertilitas dan Daya Tetas Ikan. Program Studi Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Zairin Jr, M., S. Handayani dan 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.
- Zenichiro, K., Herliantien dan Sarastina. 2002. Intruksi Praktis Teknologi Prosesing Semen Beku pada Sapi. Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari-JICA. Malang. hal.22-48.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Proses Pembuatan Semen Beku

Pembekuan sperma menurut Zenichiro dkk (2002) terdiri dari 3 proses, yaitu : adaptasi (*equilibrasi*), *Prefreezing* dan *freezing*

1. *Equilibrasi* dilakukan di *cool top cabinet* setelah proses pengenceran dan sebelum *freezing* pada suhu 3-5°C selama kurang lebih 1 jam

2. *Filling* dan *Sealing*

Filling adalah memasukkan spermatozoa yang sudah dicampur pengencer ke dalam *mini straw*, kemudian disegel menggunakan *sealing machine*. *Mini straw* yang akan digunakan berukuran 0,25 ml.

3. *Prefreezing* dilakukan dengan meletakkan straw 3 cm diatas nitrogen cair selama 10 menit sehingga suhu turun mencapai -140°C

4. *Freezing* merupakan proses penghentian sementara kegiatan hidup sel tanpa mematikan fungsi sel dan proses hidup dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Kegiatan ini dilakukan dengan menmindahkan mini straw dari uap nitrogen cair ke dalam nitrogen cair bersuhu -196°C

Lampiran 2 Diluter AndroMed®**Komposisi:**

- Phosfolipid
- Tris
- Asam Sitrat
- Gula
- Antioksidan
- Buffer
- Gliserol
- Antibiotik
- Air

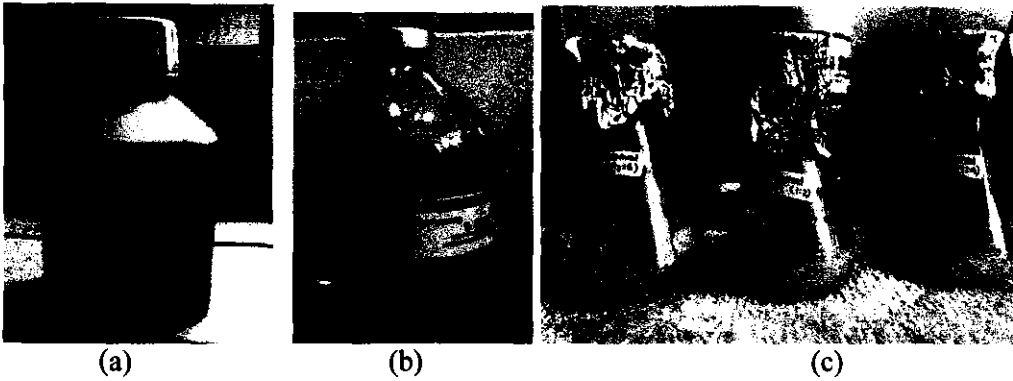
100 cc dari diluter siap pakai mengandung unit :

- Tyolisin 5 mg
- Gentamicin 25 mg
- Spectinomycin 30 mg
- Linomycin 15 mg

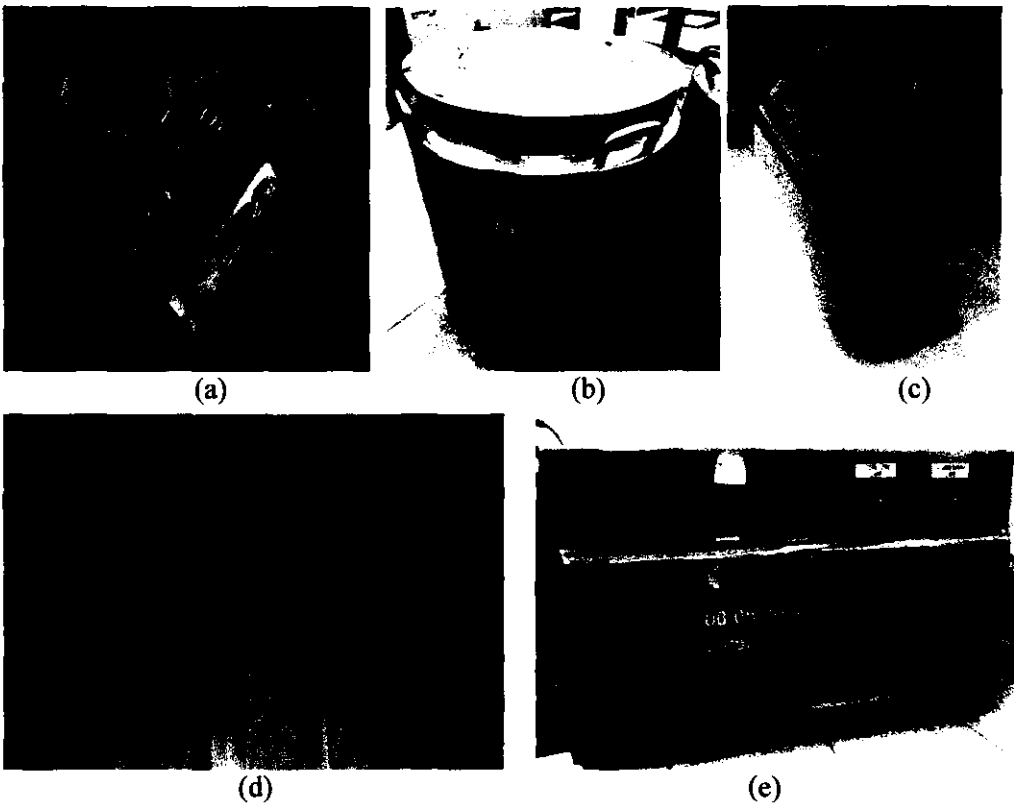
Pembuatan diluter AndroMed®

Diluter diencerkan dengan berbagai konsentrasi misalnya perbandingan 1:4. Misalnya AndroMed® 3 ml ditambahkan dengan 12 ml aquabides. Hangatkan isi dari satu botol AndroMed® dan aquabidest pada suhu yang sama ($\pm 35^{\circ}\text{C}$). Sperma dicampur dengan diluter AndroMed® secara perlahan melalui dinding tabung elenmeyer. Setelah itu langsung dimasukkan ke dalam cooling top hingga mencapai suhu $3-5^{\circ}\text{C}$.

Lampiran 3 Foto Alat dan Bahan Penelitian



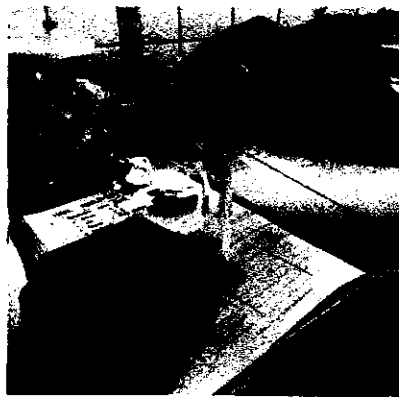
Ket : a : AndroMed[®], b : Aquabidest, c : AndroMed[®] sesuai dengan masing-masing konsentrasi setiap perlakuan



Ket : a : Erlenmeyer, Gelas Ukur, Obyek Glass, Tabung Semen, Sduit, Cover Glass, b : Container N2, c : Mini Straw, d : Improved Neubauer & Handly Conuter, e : UV Sterilization



(a)



(b)



(c)



(d)

Ket : a : Perhitungan jumlah konsentrasi spermatozoa, b : Pencampuran sperma dengan bahan pengencer, c : Peralatan untuk pemeriksaan *post thawing*, d: *stripping*

Lampiran 4 Data Hasil Pemeriksaan Sel Spermatozoa *Post Thawing*

Ulangan	Motilitas (%)			Viabilitas (%)		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3
1	19	25	8	25	28	14
2	20	19	12	16	20	17
3	18	20	10	22	25	10
4	21	22	8	19	24	18
5	12	24	10	26	21	11
6	13	20	9	21	24	6
Rata-rata	17,17	21,67	9,5	21,5	23,67	12,67

Lampiran 5 Analisis Data

Summarize
[DataSet0]

Case Processing Summary ^a						
	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Motilitas * Perlakuan	18	100,0%	0	0,0%	18	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries ^a				Motilitas
P1	1			19,00
	2			20,00
	3			18,00
	4			21,00
	5			12,00
	6			13,00
		N		6
		Mean		17,1667
	Total	Std. Error of Mean		1,53659
		Std. Deviation		3,76386
Perlakuan	1			25,00
	2			19,00
	3			20,00
	4			22,00
	5			24,00
	6			20,00
		N		6
		Mean		21,6667
	Total	Std. Error of Mean		,98883
		Std. Deviation		2,42212
P3	1			8,00
	2			12,00
	3			10,00

	4	8,00
	5	10,00
	6	9,00
	N	6
Total	Mean	9,5000
	Std. Error of Mean	,61914
	Std. Deviation	1,51658
	N	18
Total	Mean	16,1111
	Std. Error of Mean	1,35976
	Std. Deviation	5,76897

a. Limited to first 100 cases.

```
ONEWAY Motilitas BY Perlakuan
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/PLOT MEANS
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=DUNCAN ALPHA(0.05).
```

Oneway
[DataSet0]

Descriptives

Motilitas								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P1	6	17,1667	3,76386	1,53659	13,2167	21,1166	12,00	21,00
P2	6	21,6667	2,42212	,98883	19,1248	24,2085	19,00	25,00
P3	6	9,5000	1,51658	,61914	7,9085	11,0915	8,00	12,00
Total	18	16,1111	5,76897	1,35976	13,2423	18,9800	8,00	25,00

ANOVA

Motilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	454,111	2	227,056	30,500	,000
Within Groups	111,667	15	7,444		
Total	565,778	17			

Post Hoc Tests

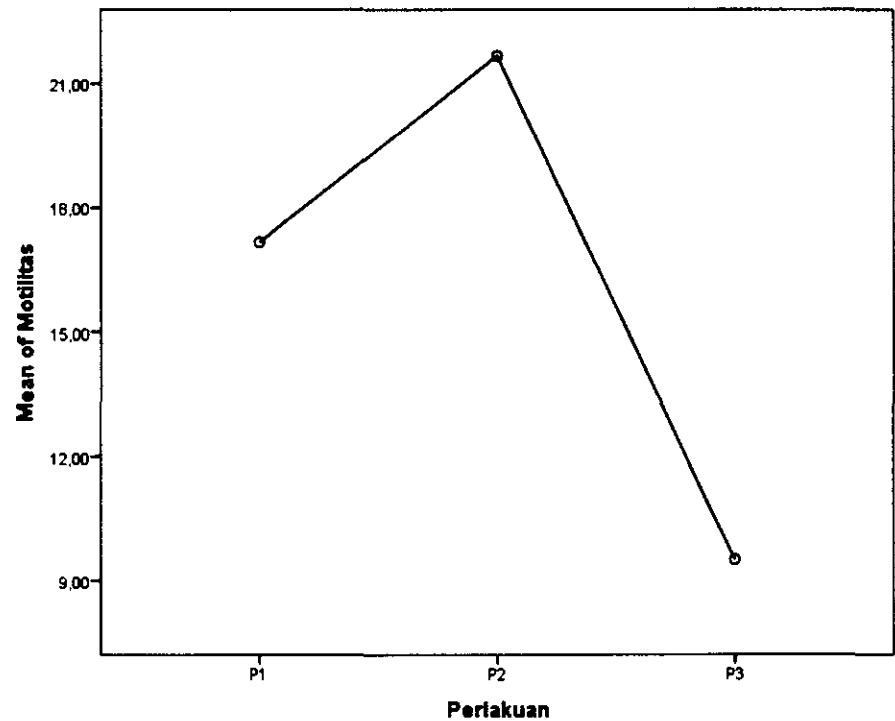
Homogeneous Subsets

Motilitas				
Duncan ^a				
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P3	6	9,5000		
P1	6		17,1667	
P2	6			21,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Means Plots



```

DATASET ACTIVATE DataSet1.
SUMMARIZE
  /TABLES=Viabilitas BY Perlakuan
  /FORMAT=VALIDLIST NOCASENUM TOTAL LIMIT=100
  /TITLE='Case Summaries'
  /MISSING=VARIABLE
  /CELLS=COUNT MEAN SEMEAN STDDEV.

```

Summarize

[DataSet1]

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Viabilitas * Perlakuan	18	100,0%	0	0,0%	18	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

			Viabilitas
P1	1		25,00
	2		16,00
	3		22,00
	4		19,00
	5		26,00
	6		21,00
		N	6
		Mean	21,5000
	Total	Std. Error of Mean	1,52206
		Std. Deviation	3,72827
Perlakuan	1		28,00
	2		20,00
	3		25,00
	4		24,00
	5		21,00
	6		24,00
		N	6
		Mean	23,6667
	Total	Std. Error of Mean	1,17379
		Std. Deviation	2,87518
P3	1		14,00
	2		17,00

	3	10,00
	4	18,00
	5	11,00
	6	6,00
	N	6
	Mean	12,6667
Total	Std. Error of Mean	1,85592
	Std. Deviation	4,54606
	N	18
	Mean	19,2778
Total	Std. Error of Mean	1,42528
	Std. Deviation	6,04693

a. Limited to first 100 cases.

ONEWAY Viabilitas BY Perlakuan
 /STATISTICS DESCRIPTIVES
 /PLOT MEANS
 /MISSING ANALYSIS
 /POSTHOC=DUNCAN ALPHA(0.05).

Oneway

[DataSet1]

Descriptives

Viabilitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P1	6	21,5000	3,72827	1,52206	17,5874	25,4126	16,00	26,00
P2	6	23,6667	2,87518	1,17379	20,6493	26,6840	20,00	28,00
P3	6	12,6667	4,54606	1,85592	7,8959	17,4375	6,00	18,00
Total	18	19,2778	6,04693	1,42528	16,2707	22,2848	6,00	28,00

ANOVA

Viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	407,444	2	203,722	14,268	,000
Within Groups	214,167	15	14,278		
Total	621,611	17			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Viabilitas			
Duncan ^a			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P3	6	12,6667	
P1	6		21,5000
P2	6		23,6667
Sig.		1,000	,336

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Means Plots

