

**PENGARUH KONSENTRASI SUKROSA DENGAN KRIOPROTEKTAN
DIMETHYL SULFOXIDE TERHADAP KUALITAS TELUR IKAN MAS
(*CYPRINUS CARPIO LINN.*) PADA PROSES KRIOPRESERVASI**

*Effect of Sucrose Concentration with Dimethyl sulfoxide cryoprotectant on the Quality Egg
Goldfish (*Cyprinus carpio Linn.*) Cryopreservation Process*

Ganjar Adhywirawan Sutarjo

Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian dan Peternakan
Universitas Muhammadiyah Malang
Email: ganjar@umm.ac.id, gans_avo@yahoo.co.id

ABSTRACT

*This research was conducted at the Laboratory of Integrated Fisheries Department of Agriculture Faculty of Animal Husbandry, University of Muhammadiyah Malang. This study aimed to examine the effect of the concentration of sucrose solution as an extender with cryoprotectant Dimethyl sulfoxide (DMSO) on the quality of fish eggs Mas (*Cyprinus carpio Linn.*) In the cryopreservation process, so that this study can help in the process of genetic pemulyaan parent and improved seed. The design used in this study using a completely randomized design (CRD), consisting of 4 treatments with one control, each treatment was held repetitions 5 times, so there are 25 experimental units. Treatment of sucrose concentration used was 0.5 M, 1 M, 1.5 M, and 2 M to 1 M. Testing cryoprotectant DMSO hypothesize using Fingerprint Test Range. The results showed that the quality of the eggs that are morphologically goldfish in a normal condition and deserves to be the process of cryopreservation, fertilization measurement results carp eggs without treatment (control) was 80.06% and the hatching rate of 70.10%. Carp egg fertilization levels highest in treatment B 1 M sucrose concentration of 71.60%, while the lowest fertilization treatment D at a concentration of 2 M sucrose is 31.14%. Hatching or hatching highest rate at treatment B 1 M sucrose concentration of 69.89%, the lowest rate in hatching treatment D 2 M sucrose concentration of 53.78%. Sucrose is known to meet the needs of the physical and chemical energy for metabolic processes during egg storage processes besides sucrose also acts as a cryoprotectant that is not penetration into the egg cells of fish.*

Keywords: *Sucrosa, Cryopreservation oosit fish, DMSO.*

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Departemen Perikanan Terpadu Pertanian Fakultas Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh konsentrasi larutan sukrosa sebagai extender dengan krioprotektan Dimethyl sulfoxide (DMSO) pada kualitas ikan telur Mas (*Cyprinus carpio Linn.*) Dalam proses kriopreservasi, sehingga penelitian ini dapat membantu dalam proses genetik pemulyaan induk dan benih unggul. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 4 perlakuan dengan 1 kontrol, masing-masing perlakuan diadakan pengulangan sebanyak 5 kali, sehingga terdapat 25 unit percobaan. Perlakuan konsentrasi sukrosa yang digunakan adalah 0,5 M, 1 M, 1,5 M, dan dengan krioprotektan DMSO 1 M, Perlakuan D dengan konsentrasi sukrosa 2 M dengan krioprotektan DMSO 1 M. Pengujian hipotesis menggunakan Uji Sidik Ragam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara morfologis kualitas telur ikan mas dalam kondisi normal dan layak untuk dilakukan proses kriopreservasi, hasil pengukuran fertilisasi telur ikan mas tanpa perlakuan (kontrol) sebesar 80,06% dan hatching rate sebesar 70,10%. Tingkat fertilisasi telur ikan mas tertinggi pada perlakuan B konsentrasi sukrosa 1 M sebesar 71,60%, sedangkan fertilisasi terendah pada perlakuan D konsentrasi sukrosa 2 M yaitu 31,14%. Daya tetas atau hatching rate tertinggi pada perlakuan B konsentrasi sukrosa 1 M sebesar 69,89%, dengan hatching rate terendah pada perlakuan D konsentrasi

sukrosa 2 M sebesar 53,78%. Sukrosa diketahui mampu memenuhi kebutuhan fisik dan kimiawi energi untuk proses metabolisme telur pada saat proses penyimpanan selain itu sukrosa juga berperan sebagai krioprotektan yang bersifat tidak penetrasi kedalam sel telur ikan.

Kata Kunci : Sukrosa, Kriopreservasi oosit ikan, DMSO.

PENDAHULUAN

Berkembangnya teknologi budidaya ikan dari budidaya ikan secara tradisional telah menuju pada budidaya ikan secara intensif. Pengembangan Teknologi tersebut juga dialami pada kegiatan pembenihan, misalnya dengan penggunaan induk-induk yang berkualitas unggul, sehingga keberhasilan usaha pembenihan tidak lagi banyak bergantung pada kondisi alam, namun manusia telah banyak menemukan kemajuan diantaranya pemijahan dengan hipofisasi, peningkatan derajat pembuahan telur dengan teknik penetasan telur secara terkontrol, pengendalian kualitas air, teknik kultur pakan alami dan pemulyaan atau pemurnian kualitas induk ikan.

Salah satu teknik yang dapat dilakukan untuk melestarikan sumberdaya atau materi genetik induk dan benih unggul adalah melalui penyimpanan sel gamet sebagai pembawa materi genetik induk dengan menggunakan teknik kriopreservasi. Melalui teknik ini sel gamet, disimpan dalam keadaan beku. Menurut Shaw *et al.* (2000), kriopreservasi embrio telah digunakan secara luas sebagai teknologi bantu reproduksi pada program *In-vitro fertilization* (IVF) hewan induk dan manusia. Penerapan teknik kriopreservasi embrio terus meningkat karena viabilitas embrio relatif konsisten dan penerapan pada hewan induk dapat dilakukan secara komersial. Kriopreservasi oosit atau telur ikan memberikan keuntungan terhadap industri akuakultur. Karena teknologi ini membantu, contohnya mempertahankan keragaman genetik induk, memanfaatkan sperma secara efisien dan sinkronisasi reproduksi secara buatan dan konservasi exsitu bank gen spesies terancam punah, organisme indigenous dan strain yang bernilai tinggi.

Dalam teknologi ini, keberhasilan proses pengawetan telur dan sperma ditentukan oleh bahan pengencer (*ekstender*), bahan pengawet (*chryoprotectant*), rasio pengencer (*dilution ratio*), laju pembekuan dan pencairan kembali (*freezing dan thawing rate*) dan larutan pengencer pada pembuahan.

Penelitian tentang oosit zebrafish telah dilakukan oleh Babin, *et al* (2008), terkait pemaparan krioprotektan menggunakan 2 M DMSO / 2 M Metanol selama 30 menit. Sedangkan Guan (2009) membuktikan bahwa pemaparan yang terbaik adalah 10 menit dengan konsentrasi krioprotektan 2 M Me₂SO + 2 M Metanol + 1,5 Etilen glikol. Hasil penelitian Wirawan (2012), menunjukkan bahwa pada pemaparan Dimethyl sulfoxide 1 M selama waktu pemaparan telur 10 menit memberikan kualitas telur ikan mas terbaik. Konsentrasi sukrosa yang paling baik di dalam larutan vitrifikasi adalah 1,00 M – 0,05 M, perubahan ultra-stuktur oosit setelah vitrifikasi mengakibatkan terjadinya poliploidi dan mengakibatkan rendahnya tingkat perkembangan embrio domba (Djuwita, 2001). Berdasarkan penelitian tersebut, maka, dilakukan pengujian konsentrasi larutan sukrosa yang berbeda sebagai ekstender dengan krioprotektan Dimethyl sulfoxide terhadap telur atau oosit ikan mas (*Cyprinus carpio Linn.*).

Penyimpanan sel gamet atau materi genetik dapat dilakukan dengan teknik vitrifikasi, namun kendala utama pada teknik vitrifikasi adalah adanya toksisitas dari bahan pengencer, dan krioprotektan. Sering kali oosit yang disimpan dengan cara dibekukan dapat menurun viabilitas oositnya setelah *thawing*, maka perlu alternatif lain untuk mengurangi kerusakan yang terjadi setelah *thawing* yaitu dengan menggunakan konsentrasi bahan pengencer (ekstender) dan

krioprotektan yang tepat. Dengan demikian, sampai saat ini, kriopreservasi oosit masih menjadi tantangan terbesar bagi kriobiologis yang bekerja di bidang reproduksi. Kerusakan yang terjadi pada oosit yang mengalami kriopreservasi sangat variatif tergantung pada dua faktor utama yaitu karakteristik oosit dan metode yang dipergunakan sehingga penentuan metode yang akan digunakan serta kesesuaiannya dengan karakteristik sel akan sangat menentukan keberhasilan kriopreservasi. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti melakukan kajian tentang pengaruh konsentrasi larutan sukrosa dengan krioprotektan *Dimethyl sulfoxide* terhadap kualitas telur ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn.) pada proses kriopreservasi?

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari hingga April 2014, di Laboratorium Pembenihan Ikan Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Telur ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn.), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ekstender (Sukrosa), Alkohol 70%, Aquades, NaCl fisiologis 0.9 %, Nitrogen cair -196°C, Kertas tissue steril, Aluminium foil, dan Benang. Sedangkan alat yang digunakan dalam penelitian yaitu : Inkubator, Mikroskop, Evendrof, Petridish gelas, Erlenmeyer 250 ml, Spuit *disposable*, Alat bedah atau *Sectio set*, Gelas ukur 10 ml, Pipet tetes, dan Pipet volumetrik.

Metode dan Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan menguji konsentrasi sukrosa dengan

krioprotektan *Dimethyl sulfoxide* terhadap kualitas telur ikan Mas (*Cyprinus carpio* linn) pada proses kriopreservasi. Menurut Gaspersz (1991), Metode eksperimen adalah pengujian hipotesa untuk mengetahui hubungan sebab akibat penelitian yang pelaksanaannya memerlukan konsep dan variabel yang jelas dan pengukuran yang cermat. Teknik pengambilan data dilakukan dengan cara observasi langsung yaitu dengan mengadakan pengamatan secara langsung terhadap gejala-gejala subjek yang diteliti.

Adapun rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada penelitian ini ekstender yang digunakan adalah sukrosa dan krioprotektan *Dimethyl sulfoxide* (DMSO). Perlakuan A : Krioprotektan DMSO 1 M konsentrasi sukrosa 0,5 M, Perlakuan B : Krioprotektan DMSO 1 M konsentrasi sukrosa 1 M, Perlakuan C : Krioprotektan DMSO 1 M konsentrasi sukrosa 1,5 M, dan Perlakuan D : Krioprotektan DMSO 1 M konsentrasi sukrosa 2 M.

Prosedur Penelitian

Persiapan ikan uji

Ikan uji yang digunakan adalah induk betina ikan Mas (*Cyprinus carpio* linn) yang sehat dan sudah matang gonad dengan umur \pm 1-2 tahun. Sebelum ikan induk betina di stripping, terlebih dahulu dilakukan penyuntikan. Penyuntikan dengan ovaprim 0,3 ml/kg dan dilarutkan dengan larutan fisiologi 1:1. Kemudian induk betina disuntik pada bagian intra muscular, proses penyuntikan ini dilakukan dua kali, pertama 1/3 bagian dan 4 jam kemudian disuntik 2/3 bagian. Selanjutnya induk betina ikan Mas di stripping dengan mengurut bagian perutnya kearah anus. Kemudian telur ikan ditampung pada wadah mangkok plastik, ditimbang dan diberi larutan fisiologis agar tidak kering.

Persiapan Sukrosa dan DMSO

Berdasarkan penelitian Djuwita (2001), pada kriopreservasi oosit domba, Konsentrasi sukrosa yang paling baik di dalam larutan vitrifikasi adalah 0,5 M – 1 M. Pada penelitian ini konsentrasi sukrosa yang digunakan adalah 0,5 M, 1 M, 1,5 M, dan 2 M dengan konsentrasi krioprotektan Dimethyl sulfoxide 1 M.

Pelaksanaan Penelitian

Proses Vitrifikasi

Mengambil telur atau Oosit ikan Mas yang telah siap sebanyak 60 – 80 butir, tahap berikutnya telur tersebut, di pindahkan ke cawan petri, dan direndam dengan Dimethyl sulfoxide (DMSO) sesuai perlakuan sebanyak 4-5 tetes selama 10 menit. Selanjutnya, telur atau oosit dicuci dengan NaCl sebanyak tiga kali selama 2 menit, dan diberi ekstender Sukrosa sesuai perlakuan (0,5 M, 1 M, 1,5 M, dan 2 M) selama 2 menit, tahap berikut Telur ikan mas dimasukan pada eppendorf, kemudian dipapar dalam nitrogen cair dengan suhu -196°C selama 10 menit.

Setelah maturasi, oosit yang matang ini di pindahkan ke cawan petri yang berisi medium vitrifikasi, masing-masing mengandung 30-40 oosit. Selanjutnya Oosit dipapar dengan krioprotektan DMSO pada suhu ruangan selama 10 menit. Selesai pemaparan, oosit siap dikemas dalam *evendoft microtube* transparan 0,25 cc (Vajta *et al.*, 1998).

Pencairan kembali (thawing)

Setelah proses pemaparan dalam nitrogen cair -196°C, tahap selanjutnya menempatkan eppendorf pada rak tabung reaksi selama 10 menit, hal ini bertujuan untuk mengadaptasikan atau menurunkan secara bertahap suhu telur yang berada dalam eppendorf. Selanjutnya melakukan pencairan kembali dengan memasukkan eppendorf ke

dalam air dengan suhu 30°C selama 15 – 20 menit, dan menempatkan seluruh oosit ke dalam cawan petri.

Pembilasan

Pembilasan dilakukan dengan cara mengeluarkan telur ikan Mas dari eppendorf dan di tempatkan pada cawan petri, selanjutnya membilas telur tersebut dengan NaCl sebanyak 2 kali untuk menghilangkan krioprotektan DMSO. Setelah pembilasan krioprotektan, selanjutnya melakukan pengamatan kualitas telur dengan pewarnaan menggunakan *thiamin blue* di bawah mikroskop inverted perbesaran 200x, tujuannya untuk mengetahui viabilitas telur. Selanjutnya oosit dalam cawan petri ditambahkan sperma ikan Mas agar terjadi proses fertilisasi.

Parameter uji

Evaluasi oosit

Oosit diperiksa di bawah mikroskop *inverted* untuk diamati kualitasnya berdasarkan penilaian morfologis normal sebagai berikut: plasma membran intak, ooplasma bergranulasi homogen, zona pelusida dan ooplasma berbatas jelas. Sedangkan morfologi oosit yang tidak normal menunjukkan bentuk yang tidak teratur dan terjadi degenerasi dengan ooplasma gelap dan berfragmentasi. Terhadap oosit ditambahkan bahan pewarnaan. Gambaran yang akan terlihat di bawah mikroskop fluoresen adalah bila oosit hidup, ooplasmanya tidak akan menyerap warna (putih) dan bila oosit mati, ooplasmanya berwarna merah.

Fertilisasi

Fertilisasi terjadi apabila inti spermatozoa mampu membuahi inti telur dalam sitoplasma sehingga membentuk zigot. Rumus yang digunakan untuk menghitung derajat pembuahan atau fertilisasi yaitu:

$$\text{Fertilitas} = \frac{\sum \text{telur yang terbuahi}}{\sum \text{Total telur}} \times 100\%$$

Derajat penetasan

Derajat penetasan atau daya tetas adalah persentase jumlah telur yang menetas dari sejumlah telur yang dibuahi. Pengamatan pada telur yang menetas ini dilakukan mulai dari fertilisasi hingga pembuahan sampai tidak terdapat lagi telur yang menetas. Telur yang menetas ditandai dengan gerakannya yang memutar dipermukaan air, sedangkan telur yang tidak menetas berwarna kuning keruh dan tenggelam didasar substrat. Rumus yang digunakan untuk menghitung derajat penetasan yaitu:

$$\text{HR (\%)} = \frac{Pt}{Po} \times 100 \%$$

Dimana:

HR : Derajat penetasan telur (%)

Pt : Jumlah telur yang menetas (butir)

Analisa Data

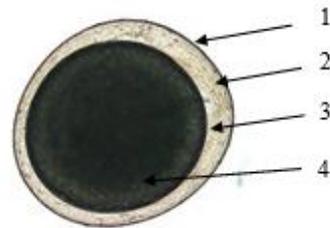
Data penelitian dianalisis dengan menggunakan *Analisis Of Variance* (Anova) menggunakan uji F. Bila sidik ragam menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata (*highly significant*) atau berbeda nyata (*significant*) maka dilanjutkan dengan uji BNT untuk mengetahui perlakuan mana yang memberikan hasil paling baik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn.)

Pengamatan telur ikan mas dilakukan untuk mengetahui dan menganalisis kualitas telur ikan mas berdasarkan ciri morfologis yaitu kondisi fisik telur seperti sel teka, zona pelusida dan warna telur sebelum dan sesudah proses kriopreservasi menggunakan Dimethyl sulfoxide (DMSO). Hasil pengamatan pada

tahap awal telur ikan mas, menunjukkan bahwa telur ikan mas yang diperoleh dari induk betina matang telur berusia 2 tahun dengan berat 1,8 kg/ekor berada dalam kondisi normal dan layak untuk dilakukan proses penyimpanan atau kriopreservasi. Untuk mengetahui kualitas telur ikan mas dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Kualitas Telur Ikan Mas (1. Sel Teka, 2. Sel Granulosa, 3. Zona Pelusida, dan 4. Inti sel)

Berdasarkan hasil pengamatan kualitas telur, diketahui bahwa telur ikan mas dalam kondisi normal ditandai dengan bentuk Lapisan sel teka terlihat sempurna, zona pelusida terlihat jelas, warna telur bening transparan, dan mampu menempel pada substrat. Sedangkan telur ikan mas yang tidak normal ditandai dengan membran plasma sel yang tidak beraturan, zona pelusida tidak terlihat jelas, warna telur putih susu, dan sel telur terapung atau tidak menempel pada substrat.

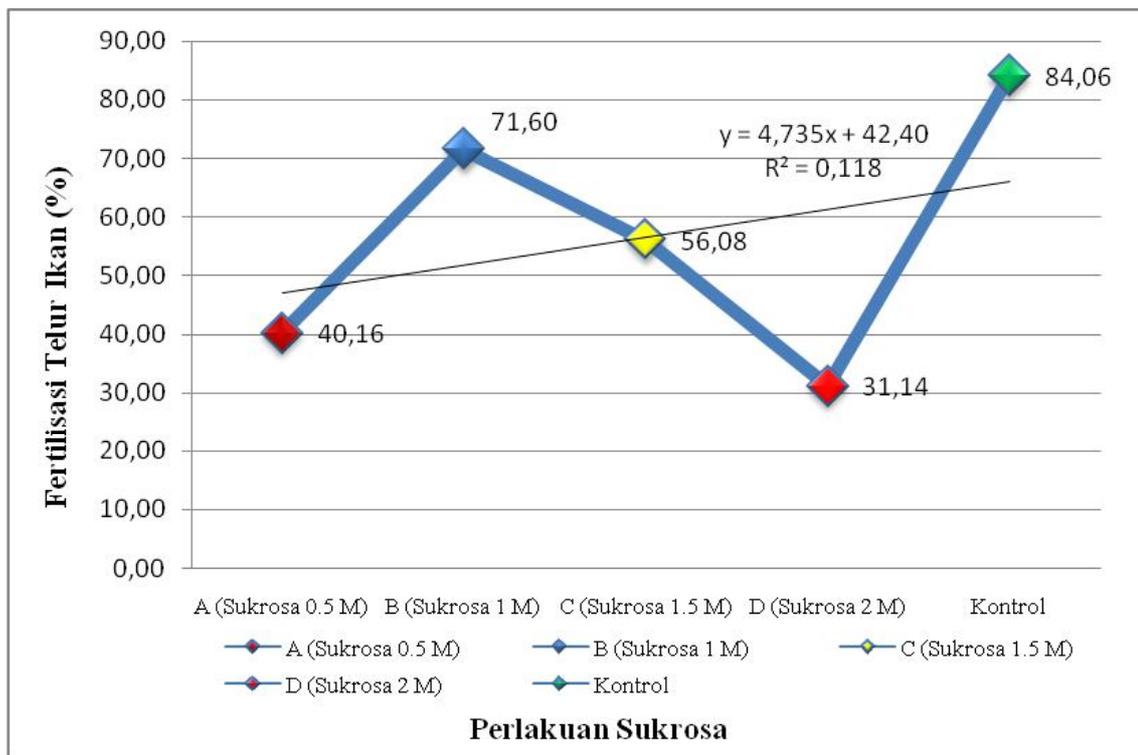
Kualitas telur dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal meliputi: umur induk, ukuran induk dan genetik. Faktor eksternal meliputi: pakan, suhu, cahaya, kepadatan dan populasi. Telur yang belum dibuahi bagian luarnya dilapisi oleh selaput yang dinamakan selaput kapsul atau kho. Selaput yang kedua dinamakan selaput vitelin, dan Selaput yang mengelilingi plasma telur dinamakan selaput plasma. Ketiga selaput ini semuanya menempel satu sama lain dan tidak terdapat ruang diantaranya. Lapisan vitelin pada ikan mas mempunyai ukuran ketebalan 10.0-10.2 μm dan mempunyai struktur yang komplek

(Linhart et al., 1995 dalam Utiah, 2006).

Fertilisasi Telur Ikan Mas

Pengamatan tingkat fertilisasi telur ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) dilakukan pada 20 - 24 jam setelah perlakuan fertilisasi. Salah satu indikator kualitas telur dan sperma yang baik adalah banyaknya telur yang dapat hidup setelah dibuahi oleh sel sperma (Yulintine,1995). Pembuahan atau

fertilisasi adalah proses bergabungnya inti sperma dengan inti sel telur dalam sitoplasma sehingga membentuk zigot. Dalam proses pembuahan, spermatozoa masuk ke dalam telur melalui lubang mikrofil yang terdapat pada khorion. Setiap sel sperma mempunyai kesempatan yang sama untuk membuahi satu sel telur. Berikut disajikan data fertilisasi telur ikan mas Gambar 2:



Gambar 2. Fertilisasi telur ikan Mas

Berdasarkan Gambar 2 di atas, menunjukkan fertilisasi telur ikan mas tertinggi pada kontrol atau tanpa perlakuan sukrosa yaitu sebesar 84,06% dan diikuti oleh perlakuan B (sukrosa 1 M) sebesar 71,60%, perlakuan C (sukrosa 1,5 M) yaitu sebesar 56,08% dan perlakuan A (sukrosa 0,5 M) sebesar 40,16%, sedangkan fertilisasi terendah pada perlakuan D (sukrosa 2 M) yaitu 31,14%. Keberhasilan derajat fertilisasi telur ikan mas yang tinggi pada kontrol dapat dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu kualitas telur dan sperma pada saat fertilisasi dalam kondisi normal atau baik. Pada konsentrasi Sukrosa 1 M diketahui bahwa konsentrasi

tersebut mampu memenuhi kebutuhan fisik dan kimiawi energi untuk proses metabolisme telur pada saat proses penyimpanan selain itu sukrosa juga berperan sebagai krioprotektan yang bersifat tidak penetrasi kedalam sel telur ikan. Peran ATP (*Adenotropin phosphate*) tercermin oleh status metabolisme dan pemeliharaan. Penurunan dan kurangnya ATP akan mempengaruhi kelangsungan hidup. Hal ini berkaitan dengan aktivitas mitokondria yang bertanggung jawab untuk memproduksi ATP dan akumulasi energi. Mitokondria sel sangat rentan terhadap proses pembekuan. Dalam penelitian ikan zebra oleh Guan, *et al.*, (2008), menunjukkan

bahwa ATP menurun oleh 42,6% setelah 30 menit inkubasi di media krioprotektan, namun, setelah pembekuan isi ATP menurun sebesar 98,3%, dan setelah 2 jam inkubasi setelah pencairan mereka menurun menjadi 0,4% dari kontrol ATP. Ini menunjukkan bahwa sebagian besar ATP intraselular mungkin telah rusak dan stres yang pada saat kriopreservasi.

Berdasarkan kondisi tersebut, maka selain penggunaan krioprotektan *Dimethyl sulfoxide* yang memiliki peran menjaga dan melindungi sel dari dalam, perlu dilakukan penambahan krioprotektan yang bekerja dari luar sel, dalam hal ini adalah sukrosa yang ditambahkan sebelum dilakukan pembekuan untuk menjaga keutuhan membran sel

dan sebagai sumber nutrisi selama proses penyimpanan. sukrosa yang merupakan disakarida yang apabila dihidrolisis berubah menjadi molekul monosakarida yaitu glukosa dan fruktosa. Sukrosa memiliki kemampuan sebagai krioprotektan non penetrating atau ekstender yang tahan terhadap tekanan osmotik untuk mengontrol peningkatan volume sel dan membatasi gerakan air melintasi membran sel (Leibo dan Mazur, 1978 dalam Tjahjani, 1997).

Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi sukrosa dengan krioprotektan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 1 M terhadap derajat pemuahan atau fertilisasi telur ikan mas maka dilakukan analisis sidik ragam yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis derajat fertilisasi telur ikan Mas.

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	9489,93	2372,48	75,17**	2,67	4,43
Galat	20	631,21	31,56			
Total	24	80116,17				

Keterangan ** = Berbeda sangat nyata (F hitung > F tabel 5% dan 1%)

Hasil analisa sidik ragam di atas, menunjukkan bahwa perlakuan sukrosa dengan krioprotektan Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 1 M berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat fertilisasi telur ikan mas, hal ini di tunjukan bila nilai F hitung

lebih besar dari pada F tabel 5% dan 1% maka dilanjutkan pada analisis Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Uji BNT dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang menghasilkan derajat penetasan tertinggi pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Derajat Fertilisasi telur ikan Mas

Rerata perlakuan	31,14	40,16	56,08	71,60	84,06	Notasi
D (31,14)	-					a
A (40,16)	9,02*					b
C (56,08)	24,94**	15,92**				C
B (71,60)	40,46**	31,44**	15,52**			D
K (84,98)	53,84**	44,82**	28,90**	13,38**	-	E

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata
* = berbeda nyata
** = berbeda sangat nyata

Tabel uji BNT di atas, menunjukkan bahwa penambahan sukrosa dengan krioprotektan *Dimethyl sulfoxide* 1 M memberikan pengaruh berbeda sangat nyata antar perlakuan terhadap tingkat fertilisasi telur ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.), dimana

pada perlakuan D (sukrosa 2 M), memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan C (sukrosa 1,5 M), selanjutnya perlakuan C memberikan pengaruh berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (sukrosa 0,5 M), perlakuan A memberikan pengaruh

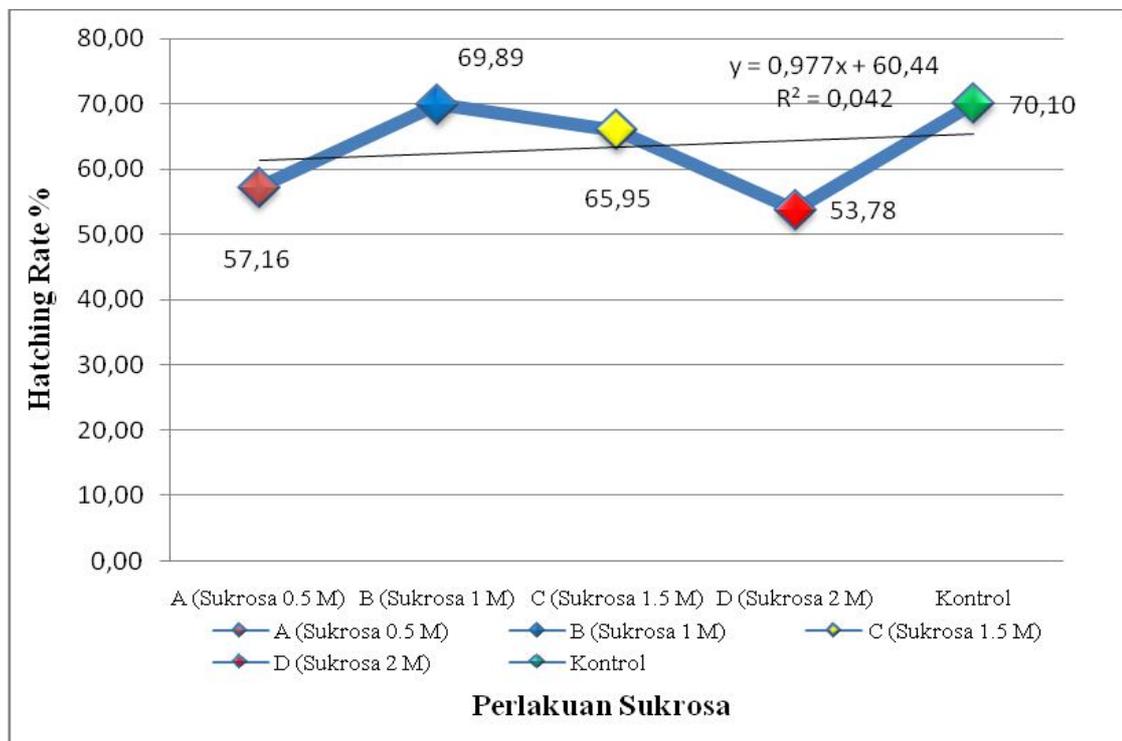
berbeda sangat nyata terhadap perlakuan B (sukrosa 1 M), selanjutnya perlakuan B memberikan pengaruh berbeda sangat nyata dengan perlakuan kontrol (tanpa pemberian sukrosa, dan DMSO).

Proteksi krioprotektan terhadap membran sel merupakan indikasi dari interaksi yang berjalan baik antara krioprotektan dan membran sel. Interaksi ini dapat mengurangi kerusakan membran sel pada saat terjadi perubahan keadaan dari relatif cair ke struktur relatif padat dan juga pada saat kembali ke struktur yang relatif cair selama proses pencairan atau thawing. Krioprotektan DMSO merupakan krioprotektan konvensional yang ditambahkan ke media sel untuk mencegah kematian sel sepanjang proses pembekuan. Titik beku DMSO tinggi, pada suhu kamar merupakan suatu padatan yang dapat membatasi kegunaannya dalam beberapa proses kimia (seperti kristalisasi pada waktu *Cooling*). *Dimethyl sulfoxide* sebagai krioprotektan penetrasi dalam sel

memiliki mekanisme kerja sebagai berikut *Dimethyl sulfoxide* akan masuk ke dalam sel telur, dan menggantikan sejumlah air bebas, selanjutnya mendesak atau mendorong keluarnya elektrolit-elektrolit intra seluler sampai pada titik konsentrasi yang tidak membahayakan bagi struktur sel telur selama proses penyimpanan pada suhu rendah.

Hatching Rate Telur Ikan Mas

Hatching rate atau Daya tetas telur ikan Mas dihitung untuk mengetahui jumlah telur terfertilisasi yang menetas setelah perlakuan kriopreservasi dengan menggunakan sukrosa dengan krioprotektan *Dimethyl sulfoxide* 1 M. Telur ikan mas menetas setelah 24 - 48 jam setelah fertilisasi. Telur yang menetas ditandai dengan adanya ekor yang dilanjutkan dengan adanya bintik mata. Berdasarkan data penelitian diperoleh daya tetas telur ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) sebagaimana disajikan pada Gambar 3:



Gambar 3. Hatching rate telur ikan Mas

Gambar 5 menunjukkan daya tetas telur ikan mas tertinggi pada perlakuan

kontrol atau tanpa penambahan sukrosa dan DMSO yaitu sebesar 70,10%, selanjutnya

perlakuan B (sukrosa 1 M) sebesar 69,89%, diikuti perlakuan C (sukrosa 1,5 M) yaitu sebesar 65,95% dan perlakuan A (sukrosa 0,5 M) sebesar 57,16%, sedangkan daya tetas terendah pada perlakuan D (sukrosa 2 M) yaitu 53,78%. Keberhasilan daya tetas telur yang tinggi pada kontrol dan perlakuan B (DMSO 1 M) dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yang meliputi kualitas telur, kualitas air dan penanganan pada saat penetasan.

Kualitas air seperti pH, DO, dan suhu sangat berperan penting, sebab perubahan kualitas air yang terjadi secara mendadak dapat menyebabkan kematian pada telur. Selain itu, kualitas telur yang baik juga dapat mempercepat penetasan, ciri telur yang baik adalah berwarna putih bening dan berbentuk

bulat atau bulat lonjong. Selama penelitian penanganan penetasan telur dilakukan pada bak inkubator, dimana kondisi kualitas air dikontrol sesuai dengan kebutuhan hidup telur ikan mas terfertilisasi sehingga angka kematian telur ikan mas dapat diminimalisir, yaitu dengan pengecekan atau pengontrolan terhadap kualitas air dalam bak inkubator. Hasil pengukuran kualitas air menunjukkan bahwa Oksigen terlarut dalam air (DO) sebesar > 5 ppm, pH air berkisar antara 7,2-8,0, dan suhu air berkisar antara 29-30°C.

Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi sukrosa dengan krioprotektan Dimethyl sulfoxide 1 M terhadap daya tetas telur ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) maka dilakukan analisis sidik ragam yang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil analisis sidik ragam daya tetas telur ikan mas.

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F1%
Perlakuan	4	1125,56	281,39	13,64**	2,67	4,43
Galat	20	412,74	20,6371			
Total	24	100415				

Keterangan ** = Berbeda sangat nyata (F hit > F tabel 1% dan 5%)

Hasil analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa, perlakuan konsentrasi sukrosa dengan krioprotektan *Dimethyl sulfoxide* 1 M berpengaruh sangat nyata terhadap daya tetas telur ikan mas, hal ini dapat dilihat pada tabel dimana nilai F hitung

lebih besar dari nilai F tabel 5% dan 1% sehingga dilanjutkan pada analisis Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Uji BNT dilakukan untuk mengetahui pengaruh dan perlakuan yang menghasilkan daya tetas tertinggi pada Tabel 4 berikut :

Tabel 4. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya tetas Telur ikan Mas

Rerata perlakuan	53,78	57,16	65,95	69,89	70,10	Notasi
D (53,78)						a
A (57,16)	3,38ns					ab
C (65,95)	12,17**	8,79*				b
B (69,89)	16,11**	12,74**	3,95ns			b
K (70,10)	16,32**	12,95**	4,16ns	0,21ns		c

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata
* = berbeda nyata
** = berbeda sangat nyata

Tabel uji BNT, menunjukkan bahwa pengaruh konsentrasi sukrosa dengan krioprotektan Dimethyl sulfoxide 1 M. Pada

perlakuan D (sukrosa 2 M) tidak berbeda nyata terhadap perlakuan A (sukrosa 0,5 M), akan tetapi perlakuan A memberikan

pengaruh berbeda nyata terhadap perlakuan C (sukrosa 1,5 M) dan perlakuan B (sukrosa 1 M), dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan Kontrol.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara morfologis kualitas telur ikan mas dalam kondisi normal dan layak untuk dilakukan proses kriopreservasi, hal ini didukung dengan hasil fertilisasi telur ikan mas tanpa perlakuan (kontrol) sebesar 80,06% dan hatching rate sebesar 70,10%. Tingkat fertisasi telur ikan mas tertinggi pada perlakuan B konsentrasi sukrosa 1 M sebesar 71,60%, sedangkan fertilisasi terendah pada perlakuan D konsentrasi sukrosa 2 M yaitu 31,14%. Daya tetas atau hatching rate tertinggi pada perlakuan B konsentrasi sukrosa 1 M sebesar 69,89%, dengan hatching rate terendah pada perlakuan D konsentrasi sukrosa 2 M sebesar 53,78%. Sukrosa diketahui mampu memenuhi kebutuhan fisik dan kimiawi energi untuk proses metabolisme telur pada saat proses penyimpanan selain itu sukrosa juga berperan sebagai krioprotektan yang bersifat tidak penetrasi kedalam sel telur ikan. Sehingga sukrosa sebagai krioprotektan bersifat tidak penetratif dan penyedia sumber energi telur ikan, dan Dimethyl sulfoxide (DMSO) yang bersifat penetrasi kedalam sel telur ikan mampu mempertahankan keutuhan sel telur, ditinjau dari keadaan morfologi telur seperti zona pelusida, membran sel, kemampuan fertilisasi, dan derajat penetasan telur.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2013. http://www.spp.gr/fish_biodiversity/EN/eBook.data/99_01_fish_guide.html. diakses 5 Pebruari 2013
- Babin, Michèle André, Jean, Anja Knoll-Gellida, David M. Rawson & Tiantian Zhang. 2008. Development of oocyte viability molecular signature (OVMS) assays for zebrafish (*Danio rerio*) oocyte cryopreservation studies. *Cybum*, 32(2) suppl.: 217.
- Djuhanda, T.dan R. Adawyah, 1981. Dunia Ikan. Amico. Bandung. 191 hal
- Guan Mo, 2009. Studies On Cryopreservation Of Zebrafish (*Danio Rerio*) Oocytes Using Controlled Slow Cooling And Vitrification. Dissertation. University of Bedfordshire.
- Guan,Mo, D.M. Rawson, T. Zhang. 2008. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Journal of Cryobiology* 56 : 204–208
- Kartamihardja E. S., 1994. Biologi Reproduksi Populasi Ikan Gabus (*Chana striata*) di Waduk Kedungombo. *Buletin Perikanan Darat* 12: 113-119
- Kottelat M., A. J. Whitten, S. N. Kartikasari, S. Wirjoatmodjo, 1993. Ikan Air Tawar Indonesia Bagian Barat dan Sulawesi. Jakarta. Periplus Editions limited.
- Morris IV, S. Berghmans, D. Zahrieh, D. S. Neuberg, J. P. Kanki, and A. T. Look. 2003. Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide. *BioTechniques* 35:956-968
- Muchlisin Z.A. 2005. Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. Vol 6, Nomor 1Halaman: 12-15
- Nagahama Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita, M. Tanaka, 1995. Regulation of oocyte maturation in fish. In Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. (eds) *Fish Physiology* Vol. XIII. New York. Academi Press.
- Nalley, W, M, M. 2007. Karakteristik semen rusa Timor (*Cervus timorensis*). Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Peternakan. Bogor. hlm.
- Peter R. E, V. L. Trudeau, B. D. Sloley, 1991. Brain Regulation of Reproduction in Teleosts. *Bull. Inst. Zoology. Academia Sinica Monograph* 16;89-118.

- Rall, W.F. 1987. Factors Affecting the Survival of Mouse Embryos Cryopreserved by Vitrification. *Cryobiology* 24: 387-402.
- Saanin, H., 1976. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan Bagian 1. Bina Cipta. Bandung. 520 hal.
- Sihombing, D. T. H., 1997. Ilmu Tenak Lebah Madu. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sopiyana, S., S. Iskandar, T. Susanti dan D. Yogaswara. 2007. Pengaruh krioprotektan DMA, DMF dan glycerol pada proses pembekuan semen ayam Kampung. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 5–6 September 2006. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 702 – 708.
- Surachman, Herdis, Yulnawati, Rizal M, dan Maheshwari H, 2008. Kualitas Semen Cair Asal Epididimis Kerbau Belang dalam Bahan Pengencer Andromed yang Mendapat Penambahan Sukrosa. Vol. 32 No. 2. Media Peternakan, Agustus 2009, hlm. 88-94
- Syafei D. S, B. B. A. Malik, H. Suherman. Asnawati., 1995. Pengenalan Jenis-Jenis Ikan Perairan Umum-Laporan. Dinas Perikanan Provinsi Jambi.
- Shaw, J.M., A. Oranratchai, and A.O. Trounson. 2000. Fundamental Cryobiology of Mammalian Oocytes and Ovarian Tissue. *J. Cryobiology* 53: 61-63.
- Tiersch, T. R., P.M. Mazik., 2000. Cryopreservation in Aquatic Species. USA: The World Aquaculture Society.
- Watson, P. F., 2000. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60 – 61: 481 – 492.
- Yildiz, C., A. Kaya, M. Aksoy, and T. Tekeli. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenol.* (54): 579-585.
- Zampolla, E. Spikings, T. Zhang, D.M. Rawson. 2009. Effect of methanol and Me2SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology* 59 : 188–194.