

Effects of Coconut Water, Glycerol, and Storage Temperature on the Viability of Catfish (*Clarias* sp.) Sperm

Restu Gusmanda Putri*, Yusni Atifah, Yuni Ahda

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatra, Indonesia;

Article History

Received : June 25th, 2026

Revised : July 21th, 2026

Accepted : July 28th, 2026

*Corresponding Author: **Restu Gusmanda Putri**, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatra, Indonesia;
Email: restugusmanda@gmail.com

Abstract: The high production of catfish (*Clarias* sp.) requires a sustainable seed supply, which is frequently constrained by the asynchronous gonad maturity of broodstock. Sperm preservation using young coconut water as a natural extender and glycerol as a cryoprotectant offers a viable solution to address this limitation. This study aimed to analyze the interactive effects of extender formulations and storage temperatures on the viability of catfish spermatozoa after four days of preservation. Semen was extracted by stripping from a single mature male broodstock weighing 3,000 g. The experiment employed a two-factor factorial Completely Randomized Design (CRD). A total of 30 experimental units consisting of 0.2 mL microtubes were used, including 27 units for the factorial treatment combinations and 3 unreplicated control units (100% young coconut water), with one control assigned to each storage temperature. The factorial treatments consisted of two factors with three replications: extender formulation (P1: 75% young coconut water + 25% glycerol; P2: 50% young coconut water + 50% glycerol; and P3: 25% young coconut water + 75% glycerol) and storage temperature (27°C, 5°C, and -20°C). Sperm viability was evaluated using 1% eosin staining and analyzed by two-way ANOVA ($\alpha = 0.05$). The results showed that storage at 27°C and -20°C caused complete spermatozoa mortality (0% viability) across all extender treatments and the control. In contrast, storage at 5°C produced the highest sperm viability in treatment P1 (82.88%), followed by P2 (65.38%), while P3 and the control exhibited 0% viability. In conclusion, the combination of young coconut water and glycerol stored at 5°C effectively maintained the viability of catfish spermatozoa, with the formulation containing 25% glycerol (P1) identified as the optimum treatment for short-term preservation.

Keywords: Catfish; Coconut water; Glycerol; Storage temperature; Spermatozoa viability.

Pendahuluan

Ikan lele (*Clarias* sp.) merupakan salah satu komoditas andalan dalam sektor perikanan budi daya air tawar di Indonesia yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan peran strategis. Merujuk pada data statistik terbaru yang dirilis oleh Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP), total produksi budi daya ikan lele secara nasional telah mencapai angka 1.212.627 ton. Angka produksi yang tinggi ini menunjukkan bahwa permintaan pasar terhadap ikan lele sangat besar, sehingga sektor budi daya sangat bergantung

pada ketersediaan benih berkualitas secara berkelanjutan. Permasalahan krusial yang dihadapi dalam proses pembenihan adalah ketidakselarasan waktu kematangan gonad (asinkronisasi) antara induk jantan dan betina. Secara biologis, ikan lele (*Clarias* sp.) memiliki tipe perkembangan oosit yang bersifat asinkron (*asynchronous type*) dan merupakan pemijah ganda (*multiple spawner*), sehingga tingkat kematangan gonad antar-individu dalam suatu populasi sering kali tidak seragam (Satriani et al., 2026). Guna mengatasi kendala ketidakselarasan matang gonad tersebut, diperlukan penerapan

teknologi penyimpanan sperma (preservasi) yang andal untuk menjamin ketersediaan spermatozoa berkualitas tinggi pada saat proses pemijahan dibutuhkan.

Pemeliharaan sperma di luar tubuh ikan selama periode tertentu merupakan tujuan utama dari teknik preservasi spermatozoa (Shazada *et al.*, 2024). Dalam bidang akuakultur, spermatozoa yang diperpanjang masa simpannya secara singkat ini utamanya dimanfaatkan untuk program reproduksi buatan, baik pada spesies ikan bernilai ekonomi tinggi maupun yang termasuk dalam kategori terancam punah. Kualitas motilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan saat penyimpanan, seperti jenis bahan pengencer, perbandingan pengenceran, serta suhu penyimpanan (Zhang *et al.*, 2026). Penggunaan bahan pengencer yang sesuai menjadi faktor penentu keberhasilan proses preservasi, karena berfungsi menciptakan lingkungan yang isotonik, menyediakan sumber energi, serta melindungi membran sel spermatozoa dari risiko kerusakan (Contreras *et al.*, 2020).

Air kelapa muda (*Cocos nucifera*) telah lama dikenal sebagai bahan pengencer alami yang menjanjikan dalam teknis reproduksi ikan. Cairan ini merupakan sumber nutrisi penting bagi spermatozoa karena kandungan glukosa dan fruktosanya yang serupa dengan cairan semen, sehingga dapat menyediakan energi bagi spermatozoa dalam proses pembuahan telur (Toelihere, 1985). Secara fisiologis, air kelapa muda memiliki karakteristik kimia yang mendukung kelangsungan hidup spermatozoa, dengan pH berkisar antara 4,6–5,5 dan osmolalitas sekitar 300–400 mOsm/kg. Selain itu, air kelapa muda kaya akan elektrolit esensial, seperti kalium (K^+), natrium (Na^+), kalsium (Ca^{2+}), dan magnesium (Mg^{2+}) (Sulmartiwi *et al.*, 2011). Karakteristik tersebut sesuai dengan kebutuhan plasma semen ikan lele (*Clarias sp.*), yang memerlukan lingkungan dengan tekanan osmotik seimbang (isotonis) serta ketersediaan ion kalium dan natrium pada konsentrasi tertentu untuk mempertahankan spermatozoa dalam keadaan tidak aktif (immotile) sebelum diaktifkan oleh air (Rahayu *et al.*, 2024).

Bahan pengencer wajib memiliki komposisi yang menyerupai cairan semen serta tidak mengandung senyawa beracun (Toelihere,

1985). Di samping itu, gliserol juga berperan penting sebagai agen pelindung sel spermatozoa. Zat ini mampu menembus membran sel dan menghasilkan fruktosa sebagai sumber energi, sehingga dapat melindungi sel dari pengaruh media eksternal. Penambahan gliserol ke dalam larutan pengencer dapat mengamankan spermatozoa dari efek lethal penurunan (Mumu, 2009).

Penelitian sebelumnya (Kurniawan *et al.*, 2013) menunjukkan bahwa kombinasi air kelapa dan gliserol memberikan pengaruh signifikan terhadap fertilisasi spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L), di mana spermatozoa masih menunjukkan kelangsungan hidup hingga penyimpanan hari keempat, akan tetapi tingkat motilitasnya berangsur menurun seiring bertambahnya masa penyimpanan. Namun, hasil temuan pada *Cyprinus carpio* tidak dapat langsung digeneralisasi pada ikan lele (*Clarias sp.*) karena adanya perbedaan karakteristik fisiologis spermatozoa yang mendasar (Biegnewska *et al.*, 2010).

Spermatozoa ikan mas bersifat lebih toleran terhadap perubahan osmotik lingkungan luar (Novianto *et al.*, 2014), sedangkan spermatozoa ikan lele memiliki sensitivitas yang jauh lebih tinggi terhadap kejutan dingin (*cold shock*) dan memiliki komposisi lipid membran sel yang berbeda (Mukti *et al.*, 2020), sehingga membutuhkan perlindungan krioprotektan yang lebih spesifik agar sel tidak lisis saat dibekukan. Kebaruan penelitian ini terletak pada pengujian interaksi antara formulasi air kelapa muda dan gliserol yang dikombinasikan secara faktorial dengan tiga variasi suhu penyimpanan, yaitu 27°C, 5°C, dan -20°C. Pendekatan ini penting untuk memetakan batas toleransi termal spermatozoa ikan lele dalam mempertahankan viabilitasnya selama proses preservasi. Oleh karena itu, penelitian ini mengisi celah ilmiah yang masih ada serta memberikan dasar dalam penyusunan protokol preservasi spermatozoa yang optimal dan aplikatif untuk mendukung pembenihan ikan lele secara berkelanjutan.

Suhu penyimpanan menjadi faktor krusial yang memengaruhi kecepatan penurunan mutu spermatozoa (Maulana *et al.*, 2017). Ketika disimpan pada suhu ambient (25–28°C), proses metabolisme spermatozoa berlangsung sangat aktif sehingga persediaan energi terkuras dengan cepat dan periode penyimpanan spermatozoa

menjadi sangat terbatas (Yulia *et al.*, 2020). Sebaliknya, pendinginan pada suhu rendah (4–5°C) yang dikategorikan sebagai metode penyimpanan dingin jangka pendek (*short-term chilled storage*), mampu menghambat aktivitas metabolisme spermatozoa (Sun & Zhang, 2024), sehingga parameter viabilitas dapat dipertahankan selama beberapa hari bila dipadukan dengan formulasi larutan pengencer yang tepat (Shalihat & Rahmawati, 2023). Pembekuan pada suhu –20°C dapat mengakibatkan cedera pada membran sel akibat pembentukan kristal es. dalam penelitian ini suhu –20°C tidak dapat dikategorikan sebagai kriopreservasi (*cryopreservation*) standar karena dilakukan tanpa adanya protokol penurunan suhu yang terkontrol maupun penggunaan nitrogen cair (Putra, 2022). Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh air kelapa dan gliserol serta perbedaan suhu penyimpanan terhadap viabilitas ikan lele (*Clarias* sp.).

Bahan dan Metode

Waktu, Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2026 di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Negeri Padang.

Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial 3 × 3 dengan tiga ulangan pada kelompok perlakuan dan control pada masing-masing suhu. Desain faktorial ini melibatkan dua faktor utama, yaitu faktor formulasi pengencer berbasis air kelapa muda dan gliserol (P1, P2, P3) serta faktor suhu penyimpanan (suhu ruang 27°C, kulkas 5°C, dan freezer -20°C). Total unit percobaan yang digunakan adalah 36 unit *microtube* berukuran 0,2 ml. Parameter utama yang diamati adalah persentase viabilitas spermatozoa ikan lele (*Clarias* sp.) setelah masa penyimpanan 4 hari.

Perlakuan

Perlakuan yang diterapkan menggunakan air kelapa muda sebagai bahan pengencer yang diperkaya dengan gliserol pada konsentrasi berbeda, yaitu: Perlakuan 1 (0,2 ml sperma + air kelapa muda 75% + gliserol 25%), Perlakuan 2

(0,2 ml sperma + air kelapa muda 50% + gliserol 50%), Perlakuan 3 (0,2 ml sperma + air kelapa muda 25% + gliserol 75%) dan control (0,2 ml sperma + 100% air kelapa muda (Lodo *et al.*, 2023)).

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi mikroskop, mikropipet, kulkas, objek glass, cover glass, timbangan analitik, termometer, mikrotube, rak mikrotube, beaker glass, spatula, alat tulis, dan tisu. Bahan utama yang digunakan adalah spermatozoa dari 1 (satu) ekor induk ikan lele jantan (*Clarias* sp.) dengan bobot badan 3.000 gram. Induk diperoleh dalam kondisi sehat, aktif, dan dipastikan telah matang gonad secara morfologi luar sebelum dibedah, yang ditandai dengan alat kelamin (papila urogenital) yang meruncing dan berwarna kemerahan. Status matang gonad tersebut kemudian dikonfirmasi secara makroskopis saat pembedahan, di mana organ testis tampak berkembang optimal, bergerigi kompak, dan berwarna merah muda. Bahan kimia dan pengencer yang digunakan meliputi larutan NaCl 0,9%, pewarna eosin 1%, air kelapa muda, dan gliserol. Seluruh prosedur penanganan dan pengorbanan hewan uji dalam penelitian ini dilakukan secara manusiawi (*humane*) sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan (*animal welfare*) untuk meminimalkan stres.

Prosedur Penelitian

Persiapan Sperma

Spermatozoa diperoleh dengan cara membedah induk ikan lele jantan secara laparotomi untuk mengambil organ testisnya. Cara pembedahan ini mutlak dilakukan karena struktur anatomi testis lele yang bergerigi dan melekat kuat di dalam rongga tubuh membuat spermanya tidak bisa dikeluarkan lewat metode pengurutan perut (*stripping*) biasa. Setelah dikeluarkan, testis dibersihkan dari sisa darah menggunakan tisu steril, lalu disayat dan diurut pelan-pelan di atas cawan petri sampai cairan spermanya keluar. Cairan sperma yang tertampung ini kemudian langsung dicampurkan ke dalam medium pengencer perlakuan (kombinasi air kelapa muda dan gliserol) secara hati-hati tanpa melalui proses penyaringan ataupun pengenceran awal dengan larutan lain. Langkah langsung ini sengaja dipilih untuk

mempertahankan komponen alami semen serta mencegah sperma mengalami stres akibat perubahan tekanan osmotik secara berulang sebelum disimpan.

Penyimpanan Sperma

Sebanyak 0,2 mL sperma dimasukkan ke dalam mikrotube menggunakan mikropipet, kemudian ditambahkan larutan pengencer sesuai perlakuan. Sperma disimpan pada suhu ruang 27°C, freezer -20°C, dan kulkas 5°C selama 4 hari (Sari & Atifah, 2026). Durasi penyimpanan selama 4 hari ini sengaja dipilih tanpa pengamatan harian karena fokus penelitian diarahkan untuk menguji efektivitas maksimum dari kombinasi medium pengencer (air kelapa muda dan gliserol) pada titik batas kritis penyimpanan jangka pendek. Rentang waktu 4 hari dinilai sebagai waktu yang optimal untuk melihat perbedaan daya tahan (viabilitas) spermatozoa secara ekstrem antar-perlakuan suhu sebelum sel mengalami penurunan kualitas total.

Pengamatan Motilitas dan Viabilitas

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan setelah 4 hari masa penyimpanan menggunakan metode pewarnaan supravital. Sebanyak 1 tetes sampel semen dicampurkan dengan 1 tetes larutan Eosin 1% di atas kaca objek (*object glass*), lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 30 detik. Sampel kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna menjadi merah akibat kerusakan membran sel, sedangkan spermatozoa yang hidup akan tampak transparan (tidak berwarna). Persentase viabilitas dihitung dengan menggunakan persamaan 1.

$$Viabilitas = \frac{Sperma\ hidup}{Sperma\ hidup + Sperma\ mati} \times 100\% \quad (1)$$

Analisis Data

Data viabilitas spermatozoa dianalisis secara kuantitatif menggunakan Analisis Varians Faktorial Dua Arah (*Two-way ANOVA*) pada taraf signifikansi 5% ($\alpha = 0,05$). Apabila hasil analisis menunjukkan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$), pengujian dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) sebagai uji lanjut. Data disajikan sebagai rerata $\pm$ standar

deviasi (SD) dari tiga ulangan. Hasil setiap perlakuan divisualisasikan dalam grafik dengan *error bar* berupa nilai SD dan notasi huruf hasil uji DMRT sebagai penanda perbedaan nyata antarperlakuan.

Hasil dan Pembahasan

Karakteristik Makroskopis Semen Kontrol

Hasil pengamatan terhadap karakteristik makroskopis sperma segar ikan lele disajikan pada Tabel 1. Parameter yang diamati meliputi volume, warna, konsistensi, dan aroma sperma. Secara umum, sperma segar yang diperoleh menunjukkan karakteristik normal dengan volume yang memadai serta sifat fisik yang mendukung kelayakan untuk dilakukan analisis lebih lanjut.

Tabel 1. Hasil pengamatan karakteristik makroskopis sperma segar ikan lele

No	Parameter	Hasil
1.	Volume	6 ml
2.	Warna	Putih Susu
3.	Konsistensi	Kental
4.	Aroma	Amis

Kualitas awal semen segar ikan lele (*Clarias* sp.) sebelum perlakuan preservasi dievaluasi melalui parameter makroskopis yang mencakup volume, warna, konsistensi, dan aroma. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa satu ekor induk jantan dengan bobot 3 kg, dan telah matang gonad, yang diambil melalui metode pembedahan testis, menghasilkan volume semen 6 ml. Seluruh semen tersebut kemudian dibagi ke dalam 30 mikrotube steril dengan volume masing-masing 0,2 ml.

Secara visual, semen kontrol menunjukkan karakteristik makroskopis yang baik, ditandai dengan warna putih susu pekat, konsistensi kental, serta aroma amis khas semen ikan sehat (Zhang *et al.*, 2025). Volume semen yang tinggi mengindikasikan bahwa metode pembedahan testis lebih efektif dibandingkan metode stripping, karena memungkinkan pengambilan seluruh spermatozoa yang terdapat dalam jaringan testis secara optimal. Struktur anatomi testis ikan lele yang kompleks dapat membatasi pengeluaran sperma apabila hanya menggunakan tekanan eksternal, sehingga metode pembedahan

lebih mampu memaksimalkan hasil ekstraksi (Cejko *et al.*, 2025).

Konsistensi kental dan warna putih susu pada semen mencerminkan tingginya konsentrasi spermatozoa dalam sampel. Secara fisiologis, tingkat kekeruhan dan kepekatan tersebut berkorelasi dengan densitas sel, yang berperan penting terhadap potensi viabilitas serta keberhasilan fertilisasi setelah proses penyimpanan.

Aroma amis yang masih tergolong normal pada semen ikan lele mengindikasikan bahwa sampel berada dalam kondisi fisiologis yang baik. Karakteristik ini mencerminkan stabilitas komposisi seminal plasma tanpa adanya indikasi degradasi atau kontaminasi mikroba (Kowalski & Cejko, 2019). Berdasarkan literatur, kualitas semen ikan yang baik ditentukan oleh kestabilan parameter makroskopis dan mikrobiologis, termasuk kondisi bau, yang berkorelasi dengan integritas sel spermatozoa (Gallego & Asturiano, 2019). Hasil evaluasi makroskopis menunjukkan bahwa semen segar yang diperoleh memiliki kualitas biologis yang tinggi dan layak digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya, khususnya pada perlakuan kombinasi air kelapa muda dan gliserol.

Viabilitas Sperma

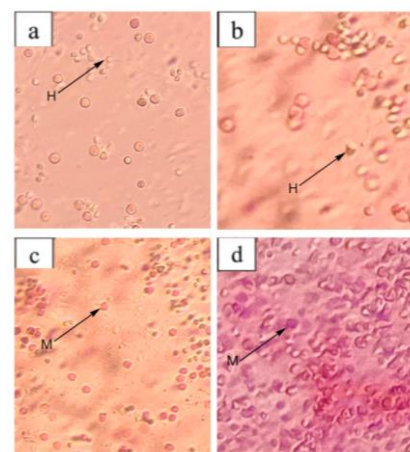
Penelitian preservasi spermatozoa ikan lele (*Clarias* sp.) selama 4 hari penyimpanan berhasil mengungkap bahwa penambahan agen krioprotektan gliserol ke dalam media pengencer alami berbasis air kelapa memberikan dampak signifikan ($P < 0,05$) dalam mempertahankan tingkat viabilitas spermatozoa pada penyimpanan dingin suhu 5°C.

Berdasarkan evaluasi mikroskopis menggunakan pewarnaan vital eosin-nigrosin, perlakuan P1 terbukti secara konsisten unggul dengan mencatat angka viabilitas tertinggi mencapai 82,88%, diikuti perlakuan P2 (50% air kelapa + 50% gliserol) sebesar 65,38%. Sebaliknya, ketiadaan zat krioprotektan pada perlakuan kontrol (100% air kelapa murni) pada suhu 5°C berakhir pada kegagalan total dengan viabilitas 0%.

Konsentrasi gliserol yang tinggi (25%, 50%, dan 75%) secara teoretis berpotensi memicu toksisitas osmotik akut pada spermatozoa. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya batas toleransi tersebut, di mana

perlakuan gliserol 75% (P3) pada seluruh suhu penyimpanan menyebabkan mortalitas total (0% viabilitas) akibat terjadinya syok osmotik (*osmotic shock*) dan dehidrasi seluler yang berlebihan. Sebaliknya, viabilitas spermatozoa masih dapat dipertahankan pada konsentrasi gliserol yang lebih moderat, yaitu P1 (25% gliserol) dan P2 (50% gliserol), khususnya pada suhu penyimpanan 5°C.

Keberhasilan tersebut secara fisiologis didukung oleh peran sinergis air kelapa muda. Elektrolit alami, seperti kalium (K^+) dan magnesium (Mg^{2+}), serta karbohidrat sederhana yang terkandung di dalamnya berfungsi sebagai osmoprotektan ekstraseluler yang membantu mempertahankan integritas membran plasma spermatozoa (Katkov *et al.*, 1998). Di sisi lain, peningkatan viskositas larutan akibat konsentrasi gliserol yang lebih tinggi memperlambat laju dehidrasi sel sehingga mengurangi terjadinya syok osmotik secara mendadak. Selain itu, interaksi antara gliserol dan komponen air kelapa membantu mempertahankan pH larutan dalam kisaran yang masih dapat ditoleransi oleh spermatozoa. Pada suhu rendah (5°C), laju metabolisme sel spermatozoa juga menurun sehingga efek krioprotektif gliserol menjadi lebih dominan dibandingkan efek sitotoksiknya (Katkov *et al.*, 1998).



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa ikan lele secara mikroskopis menggunakan metode pewarnaan vital eosin: a (P1), b (P2), c (P3), d (Kontrol). Tanda panah dengan kode H menunjukkan spermatozoa hidup, dan tanda panah dengan kode M menunjukkan spermatozoa mati.

Kematian total (viabilitas 0%) terjadi pada sampel yang disimpan pada suhu 27°C dan -20°C. Pada pewarnaan eosin 1%, seluruh kepala spermatozoa berwarna merah pekat, menandakan kerusakan membran sel. Pada suhu 27°C, kematian disebabkan oleh laju metabolisme yang tinggi, sedangkan pada suhu -20°C disebabkan oleh *cold shock* akibat pembekuan langsung tanpa tahap *equilibration*, pengaturan *cooling rate*, dan *thawing* yang sesuai, sehingga terbentuk kristal es yang merusak membran spermatozoa.

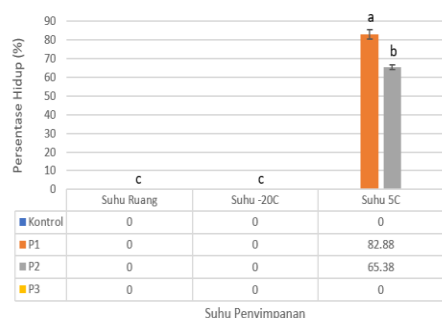
Pengamatan terhadap parameter kelangsungan hidup (viabilitas) dilakukan untuk mengetahui persentase sel spermatozoa ikan lele (*Clarias* sp.) yang mampu mempertahankan keutuhan struktural membrannya setelah melewati masa penyimpanan selama 4 hari pada

suhu dingin 5°C. Evaluasi viabilitas ini dilakukan secara mikroskopis menggunakan metode pewarnaan vital *eosin-nigrosin*, di mana sel spermatozoa yang hidup akan menolak zat warna sehingga kepala sperma terlihat jernih atau transparan, sedangkan sel yang mati akan menyerap warna eosin sehingga kepalanya tampak berwarna merah muda atau keunguan (Putra & Ducha, 2019). Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa pada perlakuan P1 dan P2 pada suhu 5°C masih terdapat spermatozoa yang hidup. Sebaliknya, pada perlakuan kontrol dan seluruh sampel pada suhu ruang serta suhu -20°C menunjukkan kematian sel menyeluruh, sebagaimana disajikan pada Gambar 1. Hasil perhitungan viabilitas spermatozoa pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Data perhitungan viabilitas spermatozoa hidup, mati, dan total sel spermatozoa ikan lele (*Clarias* sp.) pada setiap perlakuan, suhu penyimpanan, dan ulangan hari ke-4.

Suhu Simpan	Perlakuan	U I (%)	U II (%)	U III (%)	Rata-rata ± SD (%)
Suhu Ruang	Kontrol	0	0	0	0 ± 0*
	P1	0	0	0	0 ± 0*
	P2	0	0	0	0 ± 0*
	P3	0	0	0	0 ± 0*
Suhu -20°C	Kontrol	0	0	0	0 ± 0*
	P1	0	0	0	0 ± 0*
	P2	0	0	0	0 ± 0*
	P3	0	0	0	0 ± 0*
Suhu 5°C	Kontrol	0	0	0	0 ± 0*
	P1	83,63	84,94	80,08	82,88 ± 2.51
	P2	66,67	64,47	65	65,38 ± 1.15
	P3	0	0	0	0 ± 0*

*Keterangan: Nilai 0 berasal dari hasil pengamatan di seluruh ulangan (viabilitas 0%).



Gambar 2. Viabilitas spermatozoa *Clarias* sp. (%) pada berbagai kombinasi formulasi air kelapa muda dan gliserol pada tiga suhu penyimpanan

Huruf yang berbeda di atas setiap batang menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan Uji Lanjut Duncan (*Duncan's Multiple Range*

Test/DMRT) pada taraf signifikansi 5% ($P < 0,05$). Garis vertikal pada setiap batang menunjukkan standar deviasi (SD). Data kuantitatif hasil perhitungan persentase rata-rata viabilitas spermatozoa pada masing-masing perlakuan disajikan secara rinci pada Gambar 2.

Pembahasan

Viabilitas Spermatozoa pada Berbagai Perlakuan

Berdasarkan Gambar 1, nilai viabilitas spermatozoa tertinggi diperoleh pada perlakuan P1 (75% air kelapa dan 25% gliserol) dengan persentase sebesar 82,88%, kemudian diikuti oleh perlakuan P2 (50% air kelapa dan 50% gliserol) sebesar 65,38%. Sebaliknya, perlakuan kontrol

yang hanya menggunakan 100% air kelapa tanpa penambahan gliserol menunjukkan viabilitas sebesar 0%, yang menandakan seluruh spermatozoa mengalami kematian selama periode penyimpanan hingga hari keempat.

Rendahnya Viabilitas pada Perlakuan Kontrol Tanpa Gliserol

Kematian total spermatozoa pada perlakuan kontrol mengindikasikan bahwa air kelapa murni, meskipun mengandung berbagai komponen nutrisi seperti glukosa, fruktosa, asam amino, kalium, dan magnesium yang berperan dalam mendukung metabolisme sel, belum mampu memberikan perlindungan yang memadai terhadap kerusakan akibat penyimpanan pada suhu rendah. Selain karena ketiadaan zat krioprotektan penembus sel, kematian total ini juga dipastikan bukan disebabkan oleh faktor teknis di luar perlakuan. Kondisi lingkungan media kontrol seperti nilai pH dan osmolalitas telah disesuaikan agar tetap isotonis bagi spermatozoa, serta proses preparasi yang aseptik meminimalkan adanya risiko kontaminasi jaringan ataupun kontaminasi bakteri pada organ testis selama pengamatan.

Selama penyimpanan pada suhu 5°C, spermatozoa yang tidak mendapatkan perlindungan krioprotektan rentan mengalami kerusakan membran akibat perubahan tekanan osmotik dan pembentukan kristal es di dalam sel. Pembentukan kristal es tersebut dapat merusak struktur lipid bilayer membran plasma, menyebabkan hilangnya integritas membran, terganggunya fungsi fisiologis sel, serta berakhir pada lisis dan kematian spermatozoa. Temuan ini sejalan dengan pendapat (Rohmah *et al.*, 2020) yang menyatakan bahwa membran plasma spermatozoa ikan sangat sensitif terhadap kejutan suhu rendah (*cold shock*), sehingga keberadaan krioprotektan menjadi faktor penting dalam menjaga integritas struktural dan fungsional sel selama proses penyimpanan dingin.

Efektivitas Gliserol 25% dalam Mempertahankan Viabilitas Spermatozoa

Tingginya viabilitas spermatozoa pada perlakuan P1 (82,88%) menunjukkan bahwa penambahan gliserol sebesar 25% mampu memberikan perlindungan yang paling efektif selama penyimpanan. Gliserol merupakan krioprotektan penetran yang memiliki ukuran molekul relatif kecil sehingga dapat menembus membran sel dan berdifusi ke dalam sitoplasma. Di

dalam sel, gliserol berinteraksi dengan molekul air sehingga mengurangi pembentukan kristal es dan menurunkan titik beku cairan intraseluler. Mekanisme tersebut berperan dalam menjaga stabilitas lingkungan intraseluler serta mempertahankan integritas membran plasma selama penyimpanan. Membran yang tetap utuh memungkinkan spermatozoa memanfaatkan kandungan nutrisi yang terdapat dalam air kelapa secara optimal untuk mempertahankan aktivitas metabolisme dan fungsi fisiologis sel.

Perbedaan kemampuan mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa tersebut diduga berkaitan dengan metode pengambilan semen yang digunakan. Pada penelitian ini, spermatozoa diperoleh melalui pembedahan dan maserasi testis, sehingga berbagai komponen jaringan, seperti protein, asam amino, dan lipid, turut terlepas ke dalam media. Secara biologis, keberadaan protein ekstraseluler dari suspensi jaringan testis ini diduga berfungsi sebagai agen penyalut makromolekul (*macromolecular crowding*) yang menstabilkan membran luar sel, sementara kandungan lipid bebasnya membantu meminimalkan kebocoran fosfolipid membran spermatozoa akibat cekaman dingin (*cold shock*) (Zuhdi & Ducha, 2022). Sinergisme protektif antara protein-lipid eksogen dari jaringan testis dengan gliserol intraseluler ini terbukti efektif menjaga viabilitas sel selama penyimpanan dingin (Ali *et al.*, 2025). Sebaliknya, spermatozoa ikan mas pada penelitian Lodo *et al.*, (2023) diperoleh melalui metode *stripping*, sehingga kandungan senyawa protektif dari jaringan testis relatif lebih sedikit dan spermatozoa menjadi lebih rentan terhadap pengaruh suhu rendah (*cold shock*) (Untsa *et al.*, 2019).

Peran Krioprotektan dalam Menjaga Integritas Membran dan Metabolisme Sel

Menurut Anwar (2018) kemampuan krioprotektan dalam mempertahankan integritas membran plasma merupakan faktor utama yang menentukan keberhasilan penyimpanan spermatozoa pada suhu rendah. Membran plasma yang terjaga mampu mempertahankan keseimbangan lingkungan internal sel sekaligus melindungi organel penting, terutama mitokondria yang berperan dalam produksi energi melalui proses fosforilasi oksidatif. Ketersediaan energi dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP) yang tetap terjaga memungkinkan spermatozoa mempertahankan viabilitasnya dalam jangka waktu penyimpanan

yang lebih lama. Kondisi tersebut diduga menjadi salah satu faktor yang mendukung tingginya viabilitas spermatozoa pada perlakuan P1.

Dampak Peningkatan Konsentrasi Gliserol terhadap Viabilitas Spermatozoa

Meskipun demikian, peningkatan konsentrasi gliserol hingga 50% pada perlakuan P2 justru menyebabkan penurunan viabilitas menjadi 65,38%. Penurunan ini terlihat signifikan jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol P3 (0% gliserol) yang tidak mendapatkan paparan zat krioprotektan eksternal, yang mengindikasikan bahwa viabilitas spermatozoa sangat dipengaruhi oleh dosis krioprotektan yang diberikan.

Hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan gliserol dalam konsentrasi yang terlalu tinggi dapat memberikan efek negatif terhadap kelangsungan hidup spermatozoa. Hal ini sejalan dengan pernyataan Zairin Jr *et al.*, (2005), di mana konsentrasi optimum gliserol umumnya berada pada rentang yang jauh lebih rendah, yaitu sekitar 10% hingga 15%, untuk menghasilkan laju viabilitas dan motilitas pasca-thawing yang tertinggi.

Konsentrasi gliserol yang berlebihan berpotensi menimbulkan stres osmotik akibat perbedaan konsentrasi zat terlarut yang tinggi antara lingkungan ekstraseluler dan intraseluler. Kondisi tersebut menyebabkan keluarnya air dari dalam sel secara berlebihan sehingga memicu dehidrasi seluler. Akibatnya, spermatozoa mengalami penyusutan volume sel, gangguan pada struktur internal, serta penurunan fungsi berbagai komponen seluler. Selain itu, dehidrasi yang berlebihan dapat memicu denaturasi protein dan menghambat aktivitas enzim yang berperan dalam metabolisme energi, sehingga berdampak pada menurunnya tingkat viabilitas spermatozoa (Susiana, Umi Kalsum, 2021).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan komposisi pengencer yang memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan penelitian Kurniawan *et al.* (2013). Pada penelitian tersebut, kombinasi 50% air kelapa dan 50% gliserol menghasilkan kualitas spermatozoa yang optimal, sedangkan pada penelitian ini viabilitas spermatozoa ikan lele tertinggi diperoleh pada perlakuan P1 dengan komposisi 75% air kelapa dan 25% gliserol. Perbedaan tersebut mengindikasikan bahwa respons spermatozoa terhadap konsentrasi gliserol bersifat spesifik antarspesies. Pada ikan lele,

peningkatan konsentrasi gliserol di atas 25% diduga tidak memberikan keuntungan tambahan, bahkan berpotensi menurunkan kualitas spermatozoa. Temuan ini sejalan dengan pendapat Kurniawan (2013) yang menyatakan bahwa gliserol dalam konsentrasi tinggi dapat menimbulkan efek toksik, mengganggu permeabilitas membran sel, serta menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa.

Konsentrasi Gliserol Optimum untuk Mempertahankan Viabilitas Spermatozoa

Hasil penelitian ini mendukung pernyataan Muchlisin *et al.*, (2015) bahwa gliserol merupakan krioprotektan yang efektif, namun penggunaannya harus disesuaikan dengan batas toleransi fisiologis spermatozoa ikan. Konsentrasi gliserol yang melebihi tingkat optimum dapat menyebabkan gangguan keseimbangan osmotik, meningkatkan risiko kerusakan membran, memicu peroksidasi lipid, serta menurunkan persentase spermatozoa hidup selama penyimpanan. Berdasarkan parameter viabilitas yang diamati, perlakuan P1 dengan komposisi 75% air kelapa dan 25% gliserol merupakan formulasi yang paling efektif dalam mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa ikan lele (*Clarias* sp.) selama penyimpanan pada suhu 5°C.

Kesimpulan

Kondisi penyimpanan terbaik diperoleh pada suhu dingin 5°C dengan perlakuan P1 (75% air kelapa + 25% gliserol) yang mampu mempertahankan viabilitas tertinggi sebesar 82,88% hingga hari ke-4. Namun, batas temuan menunjukkan peningkatan gliserol di atas 25% memicu cekaman osmotik yang menurunkan viabilitas (P2 menjadi 65,38%) hingga kematian total pada P3 (0%), sama halnya dengan kegagalan penyimpanan pada suhu ruang dan -20°C akibat *cold shock*. Untuk itu, direkomendasikan melakukan pengujian parameter motilitas dan laju fertilisasi guna memastikan kualitas fungsional spermatozoa pasca penyimpanan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis juga menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Nurul Hanifa, selaku rekan tim peneliti, atas kontribusi aktif, dedikasi di laboratorium, serta kerja sama yang

solid dalam seluruh rangkaian pengumpulan data.

Referensi

- Ali, M. K., Riwu, A. R., & Kune, P. (2025). Penambahan level gliserol dalam pengencer mulberry iii terhadap kualitas semen cair pada babi duroc. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan*, 9(1), 124–132.
- Anwar, P., & Jiyanto, J. (2018). Efektivitas Sukrosa sebagai Proteksi Aktif Membran Ekstraseluler Spermatozoa Sapi Bali pada Zona Pre-Freezing. *Jurnal Agripet*, 19(1), 77–84.
<https://doi.org/10.17969/agripet.v19i1.14468>
- Biegñiewska, A., Zięta, M. S., Rurangwa, E., Ollevier, F., Swierczynski, J., & Skorkowski, E. F. (2010). Some differences between carp (*Cyprinus carpio*) and African catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa motility. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 674–677.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01537.x>
- Cejko, B. I., Krejszeff, S., Cejko, A. A., & Dryl, K. (2025). Evaluating sperm characteristics from stripping and testicular extraction in northern pike (*Esox lucius*) with a focus on stability during storage. *Animal Reproduction Science*, 274, 107789.
- Contreras, P., Dumorné, K., Ulloa-Rodríguez, P., Merino, O., Figueroa, E., Farías, J. G., Valdebenito, I., & Risopatrón, J. (2020). Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1373–1389.
<https://doi.org/10.1111/raq.12387>
- Gallego, V., & Asturiano, J. F. (2019). Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 697–724.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12253>
- Katkov, I. I., Katkova, N., Critser, J. K., & Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37(4), 325–338.
<https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2128>
- Kowalski, R. K., & Cejko, B. I. (2019). Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94–108.
- Kurniawan, I. Y., Basuki, F., & Susilowati, T. (2013). Penambahan air kelapa dan gliserol pada penyimpanan sperma terhadap motilitas dan fertilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1), 51–65.
<http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jfpik>
- Lodo, S. M., Tjendanawangi, A., & Linggi, Y. (2023). Pengaruh Kombinasi Air Kelapa Muda Dan Gliserol pada Presevasi Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Aquatik*, 6(1), 114–120.
<https://doi.org/10.35508/aquatik.v6i1.9876>
- Maulana, F., Alimuddin, A., & Junior, M. Z. (2017). Morfologi, fisiologi, preservasi sel sperma ikan betok, *Anabas testudineus* Bloch 1792 dan ketahanannya terhadap kejutan listrik. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 14(3), 211–223.
- Muchlisin, Z. A., Nadiyah, W. N., Nadiya, N., Fadli, N., Hendri, A., Khalil, M., & Siti-Azizah, M. N. (2015). Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*, Burchell 1822 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*, 60(1), 1–15.
<https://ojs.ubesco.com/index.php/jikm/article/download/598/822>
- Mukti, A. T., Hartri Eka, S., Hastuti Satyantini, W., & Shofy Mubarak, A. (2020). Studi Pendahuluan: Pengaruh Krioprotektan yang Berbeda terhadap Persentase Kerusakan dan Penetasan Embrio Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(3), 214.
<https://doi.org/10.20473/jafh.v9i3.16562>
- Mumu, M. I. (2009). Viabilitas semen sapi simental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. *Agroland: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 16(2), 172–179.
- Novianto, B. R., Sudarno, & Masithah, E. D. (2014). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Gliserol Dalam Susu Skim Kuning Telur Untuk Proses Penyimpanan Sperma Beku Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan*

- Kelautan, 6(1), 1–6.
<http://www.biotropika.ub.ac.id/index.php/biotropika/article/view/178>
- Putra, A. S. (2022). Efek penambahan krioprotektan pada kriopreservasi sperma ikan komoditas lokal. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 21(1), 45–54.
- Putra, & Ducha. (2019). Viabilitas Spermatozoa Kambing Boer Pasca Pembekuan dalam Pengencer Tris Dasar Soya dengan Kombinasi Gula yang Berbeda. *LenteraBio*, 8(1), 31–35.
<http://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lentera bio>
- Rahayu, S., Triandari, A., Isna Hapsari, A. H., Iskandar, R., Warih Marhendra, A. P., & Soewondo, A. (2024). The Effect of Storage Time on The Quality of Common Carp Sperm (*Cyprinus carpio*) Strain Punten in NaCl Solution and Coconut Water (*Cocos nucifera* L.) Extender. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 12(1), 40–48.
<https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2024.012.01.05>
- Rohmah, Q., Santoso, H., & Zayadi, H. (2020). Pengaruh Kombinasi Bahan Pengencer Air Kelapa, Kuning Telur dan Gliserol terhadap Normalitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal SAINS ALAMI (Known Nature)*, 2(2), 28–37.
<https://doi.org/10.33474/j.sa.v2i2.3739>
- Sari, W. Y., & Atifah, Y. (2026). Effects of Young Coconut Water and Honey as Solvents on *Clarias gariepinus* Catfish Sperm Viability. *Biologi Tropis*.
- Satriani, G. I., Kartina, K., & Mariani, A. (2026). Induksi Pematangan Gonad Ikan Lele (*Clarias* sp.) Menggunakan Oodev dengan Teknik Penyuntikan. *AKADEMIK: Jurnal Mahasiswa Humanis*, 6(2), 799–807.
<https://doi.org/10.37481/jmh.v6i2.1958>
- Shalihat, S., & Rahmawati, R. (2023). Pengaruh jenis larutan extender terhadap viabilitas sperma ikan tawar pada penyimpanan suhu dingin. *Jurnal Riset Akuakultur*, 18(2), 89–98.
- Shazada, N. E., Alavi, S. M. H., Siddique, M. A. M., Cheng, Y., Zhang, S., Rodina, M., Kocour, M., & Linhart, O. (2024). Short-term storage of sperm in common carp from laboratory research to commercial production—A review. *Reviews in Aquaculture*, 16(1), 174–189.
<https://doi.org/10.1111/raq.12827>
- Sulmartiwi, L., Ainurrohman, E., & Mubarak, A. S. (2011). Pengaruh Konsentrasi Air Kelapa Muda dan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Motilitas dan Lama Hidup Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) [The Effect of Concentration Young Coconut Water and Honey in 0,9% Sodium Chloride to Motility and Life Time Catfish (*Pangasius pangasius*) Spermatozoa]. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 3(1), 67–72.
<https://doi.org/10.20473/jipk.v3i1.11626>
- Sun, X., & Zhang, Y. (2024). Short-term low-temperature storage and cryopreservation of freshwater fish sperm: A review. *Aquaculture International*, 32(1), 112–125.
- Susiana, Umi Kalsum, S. (2021). Effect of Glycerol Concentrations in Yolk-Skin Extenders on Motility, Viability and Abnormalities of Sumba Ongole Bull Spermatozoa. *REKASATWA: Jurnal Ilmiah Peternakan*, 3(2), 98–104.
- Toelihere, M. R. (1985). *Inseminasi Buatan Pada Ternak* (Cetakan 3). Angkasa.
- Untsa, A. T., Sutarjo, G. A., & Hakim, R. R. (2019). Simple storage of sperm cells using combination of coconut and glycerol water towards motility and viability of Koi sperm (*Cyprinus carpio*). *IJOTA (Indonesian Journal of Tropical Aquatic)*, 2(1), 25–32.
<https://doi.org/10.22219/ijota.v2i1.7327>
- Yulia, S., Atifah, Y., & Saleh, D. M. (2020). Efektifitas penggunaan jenis ekstender madu dan air kelapa terhadap viabilitas sperma ikan lele dumbo selama proses preservasi. *Jurnal Biologi Tropis*, 20(2), 175–182.
- Zairin Jr, M., Handayani, S., & Supriatna, I. (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.
<http://jurnalakuakulturindonesia.ipb.ac.id>
- Zhang, S., Peng, S., Gao, Y., Ma, Z., França, T. S., Cheng, Y., Shazada, N. E., Fernández-García, F., Pérez-Sánchez, J., Asturiano, J. F., Boryshpolets, S., Rodina, M., Linhart, O., & Havlíková, Z. (2026). Species-

- specific responses of fish sperm to thermal incubation and activation during short-term storage. *Aquaculture*, 611(May 2025). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742971>
- Zhang, S., Waghmare, S. G., Alavi, S. M. H., Shazada, N. E., Cheng, Y., Muthu, K. E. S., Vechtová, P., Brionne, A., Nayak, R., Ma, Z., Labbé, C., Linhart, O., & Linhartová, Z. (2025). High temperature induces motility of zebrafish sperm after short-term storage. *Aquaculture*, 595(June 2024). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741623>
- Zuhdi, M. N., & Ducha, N. (2022). Pengaruh Penambahan Albumin Telur dalam Pengencer Dasar Tris Soya Terhadap Kualitas Spermatozoa Domba Ekor Gemuk (DEG) pada Penyimpanan Refrigerator (4-5 o C) The Effect of Egg Albumin Addition in Tris Soya Basic Diluent on the Fat Tailed Lamb (FTL). *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(1), 26–35.