



KEMENTERIAN PERTANIAN DAN
KETERJAMINAN MAKANAN



MANUAL KRYOAWETAN SPERMA IKAN KERAPU KERTANG

Epinephelus lanceolatus

- CHE ZULKIFLI CHE ISMAIL -



**MANUAL KRYOAWETAN SPERMA
IKAN KERAPU KERTANG**
Epinephelus lanceolatus

CHE ZULKIFLI CHE ISMAIL

**INSTITUT PENYELIDIKAN PERIKANAN PULAU SAYAK
08500 KOTA KUALA MUDA
KEDAH**

Cetakan 2025

Institut Penyelidikan Perikanan, Jabatan Perikanan Malaysia

Hakcipta terpelihara. Tidak dibenarkan mengeluarkan mana-mana bahagian artikel, ilustrasi dan isi kandungan buku ini dalam apa juga bentuk dan dengan apa juga medium sama ada secara elektronik, fotokopi, mekanik, rakaman atau cara lain sebelum mendapat izin daripada Ketua Pengarah Perikanan Jabatan Perikanan Malaysia. Perundangan adalah tertakluk kepada pertimbangan royalti atau honorarium.

All right reserved. No part of the articles, illustration and content of this awamation may be reproduced in any form and by any means, electronics, photocopying, mechanical, recording or otherwise without prior permission of the Director General of Fisheries Malaysia. Negotiations are subject to the calculation of royalty and honorarium.



Data Pengkatalogan-dalam-Penerbitan

Perpustakaan Negara Malaysia

Rekod katalog untuk buku ini boleh didapati
dari Perpustakaan Negara Malaysia

ISBN 978-967-2946-52-6

Di terbitkan oleh/Published by

INSTITUT PENYELIDIKAN PERIKANAN (IPP)

11960 Batu Maung

Pulau Pinang

No tel: 04-6263925/26

No faks: 04-6262210

Email: fri_helpdesk@dof.gov.my

Laman web: <https://fri.dof.gov.my>

ISI KANDUNGAN

ISI KANDUNGAN	iii
PRAKATA	v
BAB 1: PENGENALAN	1
Ikan kerapu Kertang	1
Kepentingan ikan kerapu kertang di dalam Industri akuakultur di Malaysia	2
Pengenalan kepada ikan kerapu hibrid	4
Sejarah Kryoawetan dunia dan di dalam bidang akuakultur	5
Pengenalan kepada penghasilan benih kerapu hybrid menggunakan sperma kryoawetan	6
Sejarah kryoawetan sperma ikan kerapu	7
BAB 3: KAEDAH KRIOAWETAN	9
Pengurusan Induk Jantan Kerapu Kertang	9
Pensampelan sperma ikan	11
Penyediaan <i>extender</i>	14
Pemilihan cyroprotectant	18
Bekas mengisi <i>Semen</i>	20
Tangki Penyimpanan sperma kryoawetan	21
Memasukkan semen ke dalam <i>straw/cryotube</i>	22
Kaedah Penurunan suhu	23
Thawing	25
BAB 4: KAEDAH PENGANGKUTAN SPERMA KRIOAWETAN MENGGUNAKAN AIS KERING KERING SEBAGAI MEDIUM PENYEJUKAN	27
Ais kering	28
Kaedah Pemungkusan	31
Penyediaan ais kering	31
Pemindahan sperma kryoawetan daripada tangki liquid nitrogen ke kotak Styrofoam	32

BAB 5 : KAEDAH PENGHASILAN BENIH KERAPU HIBRID MENGGUNAKAN SPERMA KRYOAWETAN	34
Pengurusan Induk Kerapu Harimau	34
<i>Pemakanan induk</i>	35
Kaedah Pembiakan Aruhan	36
<i>Pemeriksaan status telur</i>	36
Suntikan hormon untuk merangsang perkembangan ovary	37
Peleretan telur	39
Penyediaan sperma kryoawetan	40
Ternakan larva sehingga saiz benih	42
PENUTUP	44
RUJUKAN	46
DAFTAR ISTILAH	49

PRAKATA

Tujuan buku ini ditulis adalah untuk memberi gambaran kepada pembaca terutamanya yang terlibat di dalam industri akuakultur tentang teknik kryowetan sperma ikan kerapu kertang. Selain itu, buku ini juga menerangkan kaedah pengangkutan sperma kryowetan menggunakan ais kering sebagai bahan penyejuk bagi tujuan memindahkan sperma dari pusat kryowetan ke hatceri. Buku ini juga menerangkan tentang kaedah penghasilan benih kerapu hybrid menggunakan sperma kryowetan. Ia ditulis secara ringkas dan disertakan dengan gambar agar pembaca lebih mudah memahami apa yang dibaca apabila merujuk kepada gambar yang disertakan. Sasaran pembaca ialah pengusaha hatceri ikan marin, pelajar dan penyelidik di dalam bidang akuakultur dan orang awam yang berminat untuk mempelajari berkenaan kryowetan sperma ikan. Penghargaan kepada beberapa organisasi yang menyumbang di dalam penghasilan buku ini iaitu Jabatan Perikanan Malaysia (Institut Penyelidikan Perikanan), Universiti Malaysia Terengganu dan Jabatan Perkhidmatan Veteriner Malaysia. Penghargaan juga ditujukan kepada Dr. Mohd Nor Azman Ayub yang telah membuat semakan semasa proses penulisan buku ini. Dengan terbitnya buku ini, semoga ia dapat menyumbang kepada industri akuakultur marin khususnya dan industri akuakultur amnya demi keterjaminan sumber makanan negara.

BAB 1: PENGENALAN

Ikan kerapu Kertang

Ikan Kerapu Kertang atau nama Inggerisnya Giant Grouper atau dipanggil juga dengan Goliath grouper, berada di dalam family Serranidae dan subfamily Ephinephelinae. Nama saintifiknya ialah *Epinephalus lanceolatus* yang merupakan ikan laut yang mempunyai nilai komersial yang tinggi sama ada di dalam industri perikanan tangkapan atau industri akuakultur. Di habitat liar, berat kerapu kertang yang pernah direkodkan ialah seberat 400 kg dan panjangnya ialah 270 cm. Tabiat pemakanannya adalah dari jenis karnivor. Taburan di perairan dunia adalah di perairan Indo Pasifik . Ia mendiami perairan pada kedalaman sehingga 100 meter dan juga banyak mendiami kawasan terumbu karang.



Ikan kerapu kertang yang ditenak bagi tujuan pembenihan



Induk jantan ikan kerapu kertang yang digunakan untuk mendapatkan sperma bagi tujuan pembenihan

Kepentingan ikan kerapu kertang di dalam Industri akuakultur di Malaysia

Di dalam industri akuakultur, ikan kerapu kertang tergolong di dalam spesies ternakan bernilai tinggi. Ia banyak ditenak di negara-negara Asia Tenggara dan Asia Timur. Taiwan ialah antara negara pengeluar terbesar untuk spesies ini. Negara Taiwan juga banyak menghasilkan benih ikan kerapu kertang. Malaysia antara negara pengimport benih daripada Taiwan untuk industri ternakan ikan laut di Malaysia. Di Malaysia, ikan ini ditenak di sangkar terapung yang banyak terdapat di negeri Johor, Selangor, Perak, Kedah dan Terengganu dan Sabah. Kelebihan ikan kerapu kertang ialah ia lebih cepat membesar berbanding dengan ikan Kerapu Harimau. Ikan Kerapu Harimau memerlukan

tempoh ternakan selama satu setengah tahun. Manakala ikan kerapu kertang hanya memerlukan tempoh lapan bulan sehingga setahun untuk dituai. Bagi pasaran tempatan, ikan kerapu banyak dipasarkan di restoran makanan laut, manakala untuk pasaran luar negara, ikan ini banyak dieksport ke negara China dan Hong Kong.

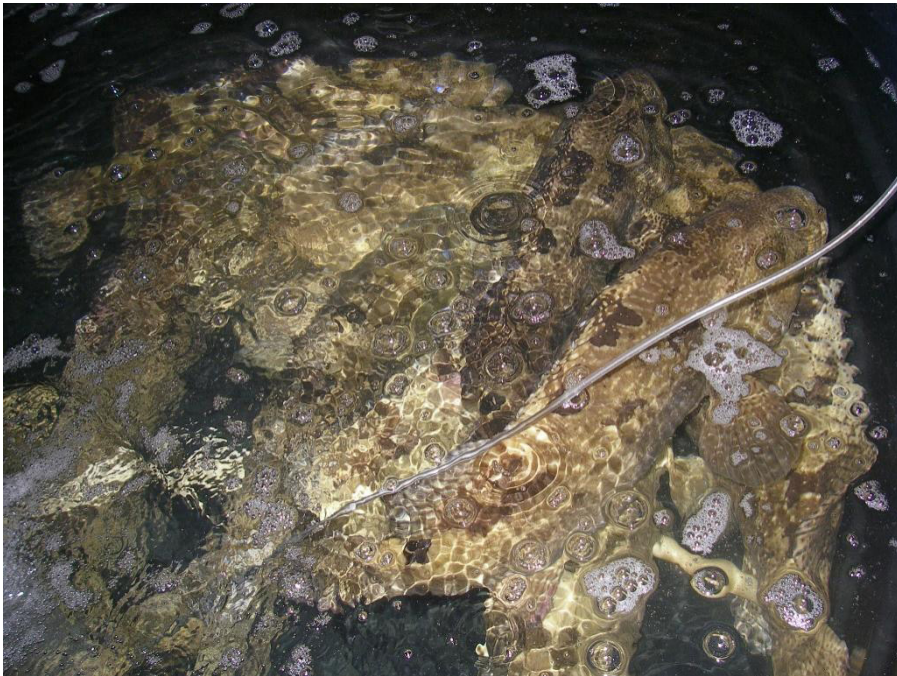
Masalah utama bagi industri akuakultur di Malaysia untuk ternakan spesies ini ialah kekurangan benih dan harga benih yang mahal. Situasi ini adalah disebabkan oleh benih perlu dimport kerana kekurangan pengeluaran benih di dalam negara. Berbanding dengan industri ternakan, industri pengeluaran benih ikan laut di Malaysia adalah jauh ketinggalan. Kekurangan teknologi Pembenihan dikalangan pengusaha hatceri dan kesukaran mendapatkan induk betina yang boleh menghasilkan gonad yang matang merupakan faktor perencat kepada penghasilan benih ikan kerapu kertang di Malaysia.



Sangkar terapung ternakan ikan laut di Malaysia

Pengenalan kepada ikan kerapu hibrid

Berbanding dengan induk betina ikan kerapu kertang, induk betina ikan kerapu harimau adalah mudah diperolehi dan boleh menghasilkan gonad yang matang melalui pemakanan dan pengurusan kualiti air ternakan. Daripada situasi ini, tercetuslah penghasilan ikan kerapu hybrid. Ia terhasil daripada kacukan antara sperma ikan kerapu kertang dengan telur ikan kerapu harimau secara aruhan. Antara ciri-ciri ikan kerapu hybrid ialah, ia lebih cepat membesar berbanding dengan ikan kerapu harimau kerana dibantu oleh genetik ikan kerapu kertang.



Ikan kerapu harimau (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Teknologi Pembenuhan telah dibangunkan oleh sekumpulan penyelidik daripada Universiti Malaysia Sabah pada pertengahan tahun 2000 an. Teknologi ini dikembangkan oleh penyelidik daripada Institut

Penyelidikan Perikanan Tanjung Demong, Besut, Terengganu sebelum dibuat pemindahan teknologi kepada hatceri swasta. Kelebihan ikan kerapu hybrid telah tersebar di kalangan penternak ikan dalam sangkar di Malaysia yang menyaksikan pertukaran spesies ternakan kerapu daripada kerapu harimau kepada kerapu hybrid.

Sejarah Kryoawetan dunia dan di dalam bidang akuakultur

Kryoawetan atau istilah Bahasa Inggeris disebut “cryopreservation” merupakan kaedah mengawet sperma organisma hidup didalam medium bersuhu rendah iaitu *liquid nitrogen*. Suhu liquid nitrogen ialah -196°C . Ia memerlukan proses tertentu sebelum sperma dimasukkan ke dalam liquid nitrogen bagi membolehkan sperma kembali aktif apabila dikeluarkan ke suhu biasa. Mengikut sejarah kryoawetan sperma, ia masih boleh digunakan setelah disimpan di dalam liquid nitrogen selama 20 tahun. Teknologi kryoawetan sperma mamalia telah bermula sejak tahun 1949 oleh Christopher Polge. Beliau telah membuat penemuan bahawa bahan gliserol dapat mengelakkan kecederaan terhadap suhu sejuk. Bagaimana pun awetan menggunakan teknik penyejukan kryo telah dicipta oleh seorang professor daripada Michigan Amerika Syarikat pada tahun 1966, di mana mayat manusia telah diawet menggunakan kaedah penyejukan kryoawetan.

Penggunaan sperma kryoawetan di dalam pembiakan aruhan di dalam bidang akuakultur telah lama dijalankan. Banyak kertas penyelidikan yang diterbitkan di jurnal akuakultur berkaitan penggunaan sperma

kryoawetan di dalam penghasilan benih ikan. Di dalam kertas penyelidikan tersebut banyak membincangkan berkenaan kaedah penyejukan di dalam mengawet sperma ikan dan juga kaedah pembiakan menggunakan sperma kryoawetan.

Pengenalan kepada penghasilan benih kerapu hibrid menggunakan sperma kryoawetan.

Penghasilan benih ikan kerapu hibrid adalah dengan menggunakan *semen* segar yang diambil terus daripada induk ikan jantan dan dicampurkan dengan telur dari ikan kerapu harimau betina. Penghasilan sperma yang berkualiti daripada *semen* ikan jantan perlu serentak dengan penghasilan telur yang telah matang. Bagaimana pun, kadang kala keadaan ini tidak berlaku. Ada kalanya telur ikan betina telah matang, manakala *semen* ikan jantan tidak berada dalam status yang bersedia di mana kualiti sperma yang tidak baik. Maka, pembiakan aruhan untuk penghasilan ikan kerapu hibrid tidak dapat dilakukan. Oleh yang demikian, untuk memastikan adanya sperma yang berkualiti semasa proses pembiakan aruhan hendak dilakukan, kryoawetan sperma ikan kerapu kertang perlu dilakukan. Sperma ikan boleh disimpan dalam waktu yang lama di dalam liquid nitrogen dan ia boleh digunakan pada bila-bila masa yang diperlukan.



Ikan kerapu hibrid

Kaedah kryoawetan telah lama digunakan di dalam pembiakan aruhan ikan. Kaedah ini sangat berguna jika menjalankan pembiakan aruhan menggunakan sperma ikan yang sukar diperolehi. Di dalam proses penghasilan benih ikan kerapu hybrid, dimana sperma ikan sukar diperolehi pada setiap masa, maka sperma kryoawetan adalah sangat berguna.

Sejarah kryoawetan sperma ikan kerapu

Kryoawetan sperma ikan kerapu adalah teknologi baru di dalam bidang pembenihan ikan laut. Kajian terawal berkenaan kryoawetan sperma ikan kerapu yang dijalankan oleh Gwo. J. C (1993) ialah pada tahun 1993. Menurut Che-Zulkifli et. al (2020), penyelidik akuakultur mula giat mengkaji bidang ini sekitar tahun 2009 . Kajian berkenaan kryoawetan

sperma ikan kerapu kertang telah dikaji oleh Fan et. al (2013). Kaedah krioawetan dipraktikkan dalam bidang akuakultur ialah kerana kesukaran untuk mendapatkan sperma segar ikan kerapu kertang pada masa yang diperlukan bagi penghasilan benih ikan kerapu hybrid. Banyak insiden terjadi dimana pada ketika telur ikan kerapu harimau telah perolehi, sperma ikan kerapu kertang tidak diperolehi daripada ikan kerapu kertang jantan. Oleh itu dengan adanya sperma kryoawetan yang boleh disimpan hingga bertahun di dalam cairan liquid nitrogen, sperma jantan ikan kerapu kertang boleh diperolehi bila-bila masa yang diperlukan. Kerja-kerja hanya diperlukan dalam pengurusan induk ikan kerapu harimau betina sahaja iaitu bagi tujuan menghasil induk yang dapat mengeluarkan telur yang berkualiti. Ia dapat dilakukan dengan cara pemberian makanan yang berkualiti kepada induk ikan bagi tujuan meransang kematangan gonad.

BAB 3: KAEDAH PENYEDIAAN KRYOAWETAN

Pengurusan Induk Jantan Kerapu Kertang

Bagi menghasilkan sperma yang berkualiti, induk jantan perlu diurus dengan baik sama ada dari segi aspek pemakanan dan pengurusan air. Induk ikan perlu berada di dalam keadaan yang kondusif bagi meransang perkembangan gonad yang baik. Dari aspek pemakanan, induk ikan perlu diberi makan ikan segar dengan kadar yang mencukupi dimana ikan tersebut tidak terlalu kenyang dan juga ikan tersebut tidak berada dalam keadaan lapar. Berdasarkan amalan di dalam akuakultur, ikan diberi makan sebanyak lima peratus daripada berat badan dalam masa sehari. Contohnya jika induk kerapu kertang ialah 100 kg, makanan yang diperlukan ialah 5 kg. Amalan biasa kekerapan diberi makan ialah sekali sehari iaitu di waktu petang. Selain ikan segar dari jenis ikan Kembong, Tongkol dan Selayang, makanan yang biasa diberi makan kepada induk ikan ialah sotong. Sotong sangat kaya dengan asid amino yang boleh meransang perkembangan gonad. Selain makanan segar, induk juga diberi makan vitamin campuran dan juga vitamin E. Vitamin boleh dimasukkan ke dalam kapsul dan dimasukkan ke dalam mulut ikan segar dan diberi makan kepada induk ikan. Minyak sotong juga boleh dijadikan sebagai makanan tambahan. Ia biasanya disuntik ke dalam badan ikan segar sebelum diberi makan.



A



B



C

A: Ikan kembong segar

B: Ikan Kebasi segar

C: Bot pukak hanyut yang sedang mendaratkan ikan segar yang baru ditangkap di laut.

Ikan segar yang sesuai diberi makan kepada induk ikan kerapu kertang jantan bagi meningkatkan kualiti sperma.

Pengurusan air juga sangat penting dalam pengurusan induk. Bagi hatceri yang mudah mendapatkan air laut yang bersih yang tidak perlukan penapisan, contohnya tempat yang sumber airnya diperolehi daripada pantai yang berbatu atau berpasir, bekalan air boleh disalurkan ke tangki dengan cara aliran terus. Air boleh dipam dari laut dan terus ke dalam tangki induk dan dialir keluar. Tetapi bagi hatceri yang berada di perairan yang berlumpur dan bekalan air laut memerlukan proses penapisan yang panjang, cukup untuk menukar air baru seratus peratus dalam masa sehari. Kualiti air yang baik boleh menjamin keberhasilan induk ikan disamping dapat mengelakkan ikan daripada dijangkiti penyakit terutamanya daripada bawaan parasit. Proses membasmi

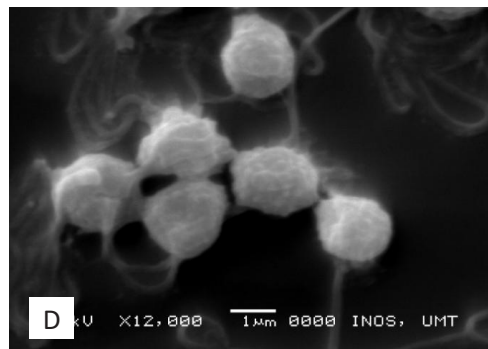
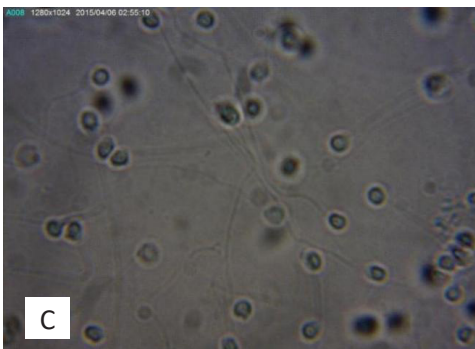
parasit harus dilakukan sentiasa dengan pendedahan kepada mandian dengan *formalin*. *Long bath* adalah proses rawatan ikan dengan masa pendedahan yang panjang dengan dos yang rendah. Manakala *short bath* adalah proses pendedahan dengan dos yang tinggi pada masa yang singkat. Dos yang biasa digunakan untuk *long bath* ialah 30 ppm dan *shot bath* ialah 150 ppm dan didedahkan selama setengah jam. Ia bertujuan untuk membunuh parasit yang melekat pada badan ikan.

Penjagaan induk jantan ikan kerapu kertang dengan baik akan menjamin penghasilan sperma yang berkualiti bagi tujuan kryoawetan. Kryoawetan memerlukan sperma yang berkualiti dimana kadar motiliti harus melebihi 80 peratus. Ini bermaksud, jika kadar motiliti sperma kurang dari 80 peratus, maka sperma tersebut tidak sesuai untuk dijalankan prosedur kryoawetan.

Pensampelan sperma ikan

Status sperma ikan perlu disampel dan diuji bagi memastikan ianya sesuai untuk kryoawetan. *Semen* disampel menggunakan alat yang dipanggil *canular* yang berupa tiub plastik lembut yang mempunyai diameter 1 mm. *Canular* perlu dimasukkan ke dalam liang pembiakan yang bersambung dengan gonad. *Semen* perlu disedut keluar sama ada menggunakan picagari atau menggunakan mulut. Status *semen* yang mempunyai sperma yang matang boleh diperhatikan dengan mata kasar berdasarkan kepada kepekatan *semen*. *Semen* yang berwarna putih pekat menandakan sperma yang matang. Keaktifan sperma boleh

diperhatikan di bawah mikroskop. Keaktifan sperma diukur berdasarkan kadar pergerakan atau pun kadar motiliti. Alat berteknologi tinggi yang digunakan untuk mengukur tahap keaktifan sperma ialah *Computer Aided Sperm Analysis (CASA)*. Komponen CASA ialah terdiri daripada komponen computer, mikroskop dan perisian yang dapat mengesan kadar motiliti sperma. Perisian CASA akan memberikan nilai bacaan motility sperma ikan. Sperma yang sesuai digunakan untuk kroawetan ialah yang mempunyai kadar motility 80 peratus ke atas.



- A: Proses pensampelan sperma ikan sedang dilakukan menggunakan *canular* yang dimasukkan ke dalam liang pembiakan.
- B: Alat CASA yang digunakan untuk menilai motility sperma ikan.
- C: Sperma ikan kerapu kertang di bawah mikroskop.
- D: Sperma dibawah mikroskop electron.

Kaedah Pengambilan *Semen* Ikan Kerapu Kertang

Semen ikan kerapu kertang diambil dengan cara menekan bahagian abdomen ikan daripada bahagian atas ke bahagian anus. *Semen* akan keluar melalui liang pembiakan yang bersambung dengan testis ikan. Pengambilan *semen* perlu dilakukan secara berhati-hati bagi mengelakkan ianya bercampur dengan air kencing dan najis. Ini kerana, liang pembiakan berada diantara liang najis yang bersambung dengan usus dan liang air kencing yang bersambung dengan buah pinggang. *Semen* yang bercampur dengan kedua-dua bahan di atas tidak boleh digunakan untuk kryoawetan. Sebaiknya, induk ikan tidak diberi makan selama 2 hari sebelum pengambilan spesimen bagi mengelakkan *semen* bercampur dengan najis. *Semen* yang keluar akan ditadah menggunakan bekas plastik yang bersih dan dimasukkan ke dalam bekas bertutup yang berisi ais. *Semen* akan dibawa ke makmal untuk proses kryoawetan.



A: Proses pengambilan *semen* ikan kerapu kertang.

B: *Semen* dimasukkan ke dalam bekas plastik yang bersih.

C: *Semen* dimasukkan ke dalam bekas berisi ais dan di bawa ke makmal untuk proses kryoawetan.

Penyediaan *extender*

Extender merupakan cecair yang dirumuskan melalui beberapa bahan kimia yang berfungsi sebagai medium untuk penyimpanan sperma kryoawetan. Ia merupakan bahan yang sangat penting di dalam proses kryoawetan sperma. Menurut Paasch *et al.*, (2004) dan Soylu *et al.*, (2007), *extender* dapat membantu didalam menstabilkan sel sperma semasa proses penyejukan dan juga pencairan. Ciri-ciri *extender* mestilah sesuai dengan sifat fizikal-kimia *semen* ikan berkenaan. Paras Osmolaliti yang tinggi dalam *extender* berbanding plasma *semen* semulajadi boleh menyekat pengaktifan sperma (Alavi *et al.*, 2010). Setiap sebatian mempunyai peranan di dalam fungsi *extender* untuk menghalang pengaktifan sperma, menyediakan sumber tenaga dan, melindungi membran (Agarwal, 2011). Kajian terhadap kryoawetan

sperma ikan Sturgeon menunjukkan bahawa ion K^+ menghalang pengaktifan sperma dalam plasma *semen*, manakala, menggunakan medium pengaktifan yang mengandungi ion Ca^{++} dapat meningkatkan prestasi pergerakan sperma yang dicairkan (Alavi et al., 2012; Gallego et al., 2013). Di dalam kajian lain, larutan *extender* memainkan peranan penting dalam kejayaan pemeliharaan *semen* biri-biri (Kulaksiz et al., 2012). Bagi ikan laut, *extender* yang paling biasa digunakan untuk kryoawetan sperma ialah larutan garam atau gula (Suquet et al., 2000). Berdasarkan kajian terdahulu, *extender* yang paling biasa digunakan untuk kryoawetan spermatozoa kerapu ialah Natrium klorida (NaCl) di mana NaCl berfungsi sebagai agen *tonicity* yang mengawal tekanan osmotik antara sel sperma (Agarwal, 2011).

Terdapat banyak bahan yang digunakan di dalam penyediaan bahan *extender*. Berikut adalah senarai bahan yang digunakan di dalam penyediaan *extender*:

- a) Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
- b) Natrium Chlorida (NaCl)
- c) Potassium bicarbonate ($KHCO_3$)
- d) Kalium Klorida (KCl)
- e) Kalsium Chlorida (CaCl)
- f) Cecair penimbal TRIS,
- g) Natrium klorida (NaCl)
- h) Magnesium Klorida (MgCl)
- i) Natrium Hidrogen Karbonat ($NaHCO_3$)
- j) Mg^{++} and Ca^{++} ions,
- k) gula,

- l) glycine,
- m) Mannitol,
- n) lecithin,
- o) yolka telur,
- p) Promine D
- q) bovine serum albumin (BSA)

Resepi penghasilan extender untuk ikan kerapu kertang ialah seperti yang dicadangkan di dalam jadual di bawah. Mengikut kajian yang dijalankan oleh Fan et al. (2014), extender yang sesuai digunakan ialah rumusan TS-19. Bagaimana pun, mengikut Che_Zulkifli et al. (2020 a), resepi terbaik untuk extender kryoawetan sperma ikan kerapu kertang ialah larutan *Artificial Seminal Plasma* (ASP) berdasarkan Koh et al. (2010).

Jadual: Resepi *extender* yang sesuai untuk digunakan dalam kryoawetan sperma ikan kerapu kertang (TS-19 & MPRS, Fan et al (2013)(ASP, Koh et al, (2010).

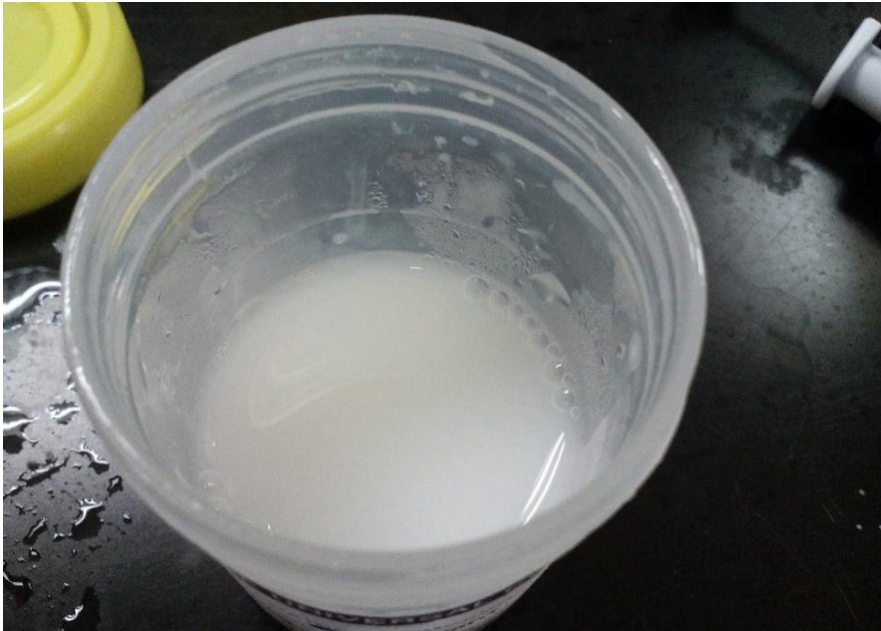
Sebatian	Kepekatan (mM)		
	TS-19	ASP	MPRS
Natrium Klorida (NaCl) (mM)	78	135	60.35
Kalsium klorida (CaCl ₂)		1.3	
Natrium Hidrogen Karbonat (NaHCO ₃) (mM)	25	20	3.0
Kalium klorida (KCL) (mM)		2	5.23
Kalsium Klorida terhidrat (CaCl ₂ 2H ₂ O)(mM)			1.13
Magnesium Klorida terhidrat MgCl ₂ 6H ₂ O(mM)			1.13
Magnesium klorida (MgCl ₂)		2.3	
D-Glucose (mM)	36		55.55
Kalium Hidrogen Karbonat (KHCO ₃) (mM)	35		
Tris (mM)	20		
Sukrosa (mM)	50		
HEPES		10	
pH	9.56	6.5	6.5
Tekanan Osmotik (mOsmol kg ⁻¹)	414	334	363



A: Bahan kimia yang digunakan untuk menghasilkan *extender*
B: Larutan *extender* yang telah dihasilkan.

Nisbah *Extender* berbanding *semen*

Beberapa penyelidik mempunyai kaedah berbeza dalam menentukan nisbah *extender* berbanding *semen* bagi kryoawetan sperma ikan kerapu. Selepas *semen* diambil dengan memicit bahagian abdomen ikan, ia dicampurkan dengan larutan *extender* pada kadar 1 nisbah 3. Jika *semen* yang diperolehi ialah 10 ml, maka larutan *extender* yang dicampurkan bersama *semen* ialah 30 ml. Campuran digoncang seketika bagi melarutkan *semen* ke dalam *extender*. Bagaimana pun, daripada sumber kajian terdahulu menunjukkan, terdapat beberapa nisbah *semen* berbanding *extender* yang dipraktikkan di dalam kryoawetan sperma ikan kerapu. Menurut Che_zulkifli *et al*, (2020a), nisbah *semen* berbanding *extender* yang pernah dipraktikkan bagi kryoawetan sperma ikan kerapu ialah 1:9, 1:49, 1:1 dan 1:4.



Semen yang telah dicampurkan dengan larutan extender.

Pemilihan cryoprotectant

Cryoprotectant berfungsi sebagai pelindung kepada sel sperma daripada kerosakan yang disebabkan oleh pembentukan hablur ais semasa pembekuan dan pencairan sperma kryoawetan (Agarwal, 2011). *Cryoprotectant* mengikat molekul air dan mengurangkan pembentukan kristal ais, serta bertindak untuk menstabilkan molekul protein terhidrat (Bhavani et al., 2003). Terdapat dua jenis *cryoprotectant* iaitu jenis meresap dan *cryoprotectant* jenis tidak meresap. *Cryoprotectant* jenis meresap mempunyai kapasiti untuk menggantikan air di dalam sel dan menghalang sel daripada mengecut melebihi isipadu minimum semasa proses penyejukan. *Cryoprotectant* jenis meresap juga dapat mengurangkan takat beku sambil meningkatkan kebarangkalian pembentukan kristal di dalam sel (Cuevas-Uribe, 2011). Contoh

cryoprotectant jenis meresap ialah Gliserol. Ia sangat berkesan dalam mengurangkan takat beku air dan juga mengurangkan pembentukan hablur ais di tahap diantara sel (Silva *et al.*, 2015). *Cryoprotectant* meresap yang lain ialah *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), Metanol, propylene glycol dan, gliserol. Contoh *cryoprotectant* yang tidak meresap ialah sukrosa, glukosa, dekstran, serum kuning telur, susu skim dan, protein anti beku (Agarwal, 2011).

Bagaimana pun, keberkesanan setiap *cryoprotectant* adalah berbeza bagi spesies ikan (Lim dan Le 2013; Liu *et al.*, 2016). Ketoksikan *Cryoprotectant* yang berkepekatan tinggi boleh diminimumkan dengan menggunakan kombinasi *Cryoprotectant* yang terpilih (Bhavani *et al.*, 2003). Jenis *cryoprotectant* yang paling banyak digunakan oleh penyelidik untuk kryoawetan sperma ikan laut telah *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (Vuthiphandchai *et al.*, 2009). DMSO juga adalah *Cryoprotectant* terbaik untuk pengawetan sperma ikan kerapu (Gwo, 1993; Tian *et al.*, 2013). DMSO ialah sebatian organosulfur dengan formula molekul $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, iaitu pelarut aprotik polar, dan biasanya digunakan dalam industri perubatan sebagai pelarut untuk tindak balas kimia yang melibatkan garam. Peratusan DMSO ditambah dalam larutan untuk kryoawetan sperma ikan ialah Sekitar antara 7% dan 20%. (Cabrita *et al.*, 2010). Kiriya *et al.*, (2011) menyatakan bahawa sperma kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) yang ditambah dengan 10 % DMSO dapat menghasilkan kadar penetasan yang lebih baik semasa pembiakan aruhan dalam pengeluaran ikan kerapu

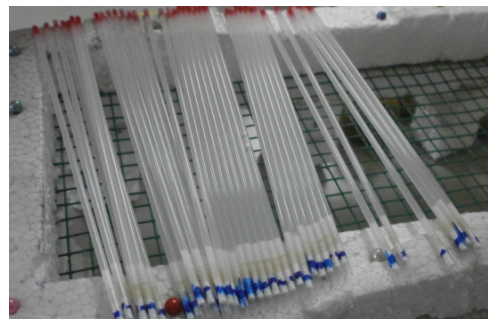
hibrid. Kelebihan utama menggunakan DMSO sebagai *Cryoprotectant* ialah ia meresap dan meninggalkan sel lebih cepat daripada *gliserol* (Jamieson, 2009). Cadangan peratusan terbaik antara *cryoprotectant* dan campuran *semen* dan *extender* ialah antara 10 % sehingga 12 %.

Bekas Penyimpanan Sperma Kryoawetan

Terdapat dua jenis bekas yang digunakan untuk mengisi *semen* iaitu *straw* dan *cryotube*. *Straw* biasanya mempunyai diameter 0.25 cm dan panjangnya kira-kira 15 cm. Kapasiti *semen* yang boleh dimasukkan ke dalam *straw* ialah kira-kira 0.5 ml. Manakala *cryotube* mempunyai diameter yang lebih besar iaitu kira-kira 0.5 cm dan panjangnya kira-kira 5 cm. *Straw* dan *cryotube* biasanya diperbuat daripada bahan plastik. Kelebihan menggunakan *straw* untuk penyimpanan *semen* ialah, ia lebih menjimatkan ruang. Banyak *straw* boleh ditempatkan di dalam *canister* untuk penyimpanan di dalam tangki cecair nitrogen. Bagi *cryotube*, bekas khas diperlukan untuk penyimpanan di dalam tangki cecair nitrogen bagi mengelakkan ia daripada terapung. *Bracket* khas juga diperlukan untuk menenatkan bekas *cryotube*.



Cryotube



Straw

Tangki Penyimpanan sperma kryoawetan

Tangki penyimpanan sperma kryoawetan adalah diperbuat daripada besi padu yang biasanya berkapasiti 50 liter. Penutup tangki biasanya diperbuat daripada plastik dan gabus . Bahagian atas tangki biasanya dibuat *slot* untuk menyangkut canister. Terdapat juga tangki cecair nitrogen yang digunakan untuk pengangkutan di mana saiznya lebih kecil. Biasanya berkapasiti 5 liter.



A: Tangki besi yang berisi cecair nitrogen untuk penyimpanan sperma kryoawetan. Kapasiti 50 liter.

B: Tangki penyimpanan cecair nitrogen untuk ditambah ke tong penyimpanan sperma.

C: *Hose* untuk memasukkan cecair nitrogen ke dalam tangki penyimpanan sperma

D: Cecair nitrogen dimasukkan ke dalam tangki penyimpanan atau pengangkutan dengan cara memasukkan *hose* ke dalam tangki dan injap dibuka.

Memasukkan semen ke dalam *straw*/*cryotube*.

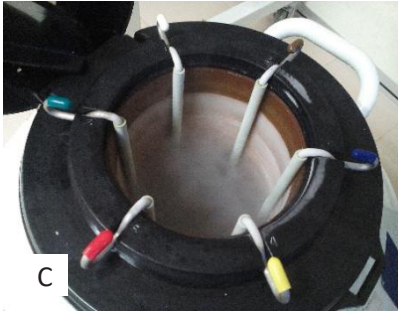
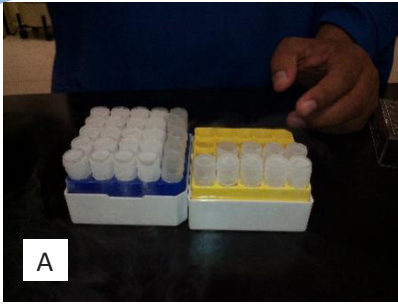
Cara mengisi semen ke dalam bekas *straw* atau *cryotube* ialah dengan menggunakan *micropipete*. Pengisian ke dalam *straw* sedikit berbeza dengan *cryotube* kerana *straw* tidak mempunyai penutup seperti *cryotube*. Bagi menutup bahagian hujung *straw*, serbuk PVC yang basahkan perlu digunakan. Selepas semen dimasukkan ke dalam *straw*, bahagian hujung *straw* perlu dicelup ke dalam serbuk PVC yang dibasahkan. Serbuk PVC yang dibasahkan akan mengeras dalam masa yang singkat dan akan menutup *straw*, dan *semen* tidak akan mengalir keluar semasa penyimpanan di dalam cecair nitrogen.



Proses memasukkan semen ke dalam *straw*



Proses menutup bahagian hujung *straw* menggunakan serbuk PVC yang dibasahkan.



- A: Bekas penyimpanan *cryotube* di dalam tong cecair *liquid*.
B: *Canister* tempat penyimpanan straw di dalam tong cecair nitrogen.
C: *Canister* di dalam *cryotube*

Kaedah Penurunan suhu

Peringkat ini merupakan peringkat yang paling penting di dalam proses kryoawetan sperma. Penurunan suhu yang tidak sesuai boleh menyebabkan sel sperma pecah dan sperma tidak akan aktif lagi selepas proses *thawing* dilakukan. Suhu perlu diturunkan daripada suhu bilik ke suhu cecair nitrogen iaitu -195°C . Terdapat alat automatik yang boleh digunakan dalam proses penurunan suhu. Penurunan suhu telah diprogramkan menggunakan alat tersebut untuk menurunkan suhu sperma daripada suhu bilik ke suhu -195°C .

Bagi proses penyejukan secara manual, langkah-langkah berikut perlu dilakukan sebelum keseluruhan *cryotube* dan *straw* direndam keseluruhannya ke dalam cecair nitrogen.

1

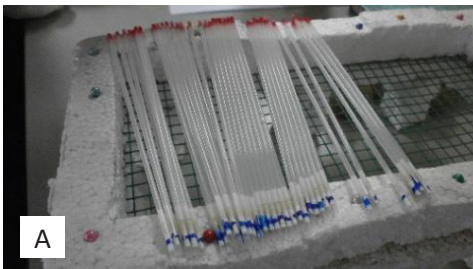
- Cecair nitrogen dimasukkan ke dalam kotak styroform yang berkapasiti kira-kira 10 liter. Kedalaman cecair nitrogen ialah kira-kira 5 cm. Straw atau cryotube yang mengandungi semen diletakkan di atas rangka styroform yang diletakkan jaring besi di bahagian atasnya. Dengan menggunakan kaki retot, gantungkan rangka styroform dan jaring besi yang telah diletakkan semen di atasnya, pada kedudukan 6 cm daripada paras cecair nitrogen selama 10 minit.

2

- Semen kemudiannya diturunkan ke paras permukaan cecair nitrogen dengan mengapungkan menggunakan bingkai Styrofoam. Ia dibiarkan pada kedudukan tersebut sehingga suhu mencapai -50°C . Suhu direkod menggunakan alat *termocouple* dimana *probe* alat tersebut dimasukkan ke dalam salah satu cryotube yang mengandungi semen dengan menebuk bahagian *cap*.

3

- Straw dan cryotube kemudiannya dimasukkan ke dalam cecair nitrogen di dalam kotak styroform tersebut. Selepas 5 minit, straw di masukkan ke dalam canister menggunakan *forcep* dan cryotube dimasukkan ke dalam *rack*. Langkah ini dilakukan di dalam kotak styroform tersebut di dalam cecair nitrogen tanpa mengangkatnya ke udara. Kemudiannya ia dipindah ke dalam tangki cecair nitrogen secara pantas untuk penyimpanan.



A



B



C



D

A: Straw yang diletakkan di atas bingkai styroform.

B: Alat *termocouple* iaitu jangka suhu yang digunakan untuk mengukur suhu yang *extreme*.

C: Straw dimasukkan ke dalam canister.

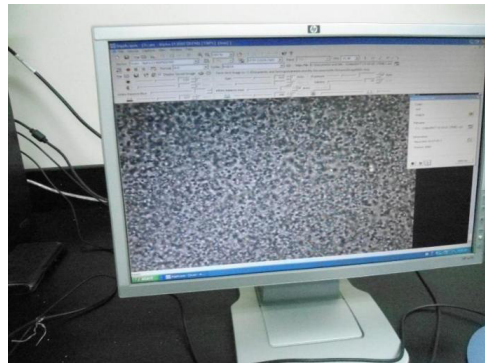
D: Canister dimasukkan ke dalam tangki cecair nitrogen.

Proses Thawing

Thawing adalah proses di mana sperma kryoawetan dipindahkan daripada suhu cecair nitrogen (-196°C) ke suhu bilik. Prosesnya sangat mudah dimana *straw* atau *cryotube* dari tangki cecair nitrogen diambil dengan menggunakan *forcep* dan dimasukkan ke dalam bekas yang berisi air bersuhu bilik. Dalam tempoh kira-kira 15 saat, sperma itu sudah boleh digunakan untuk tujuan pembenihan aruhan. Sperma yang berada dalam keadaan yang tidak bergerak semasa di dalam liquid nitrogen akan bergerak semula apabila melalui proses *thawing*. Bagi melihat pergerakan sperma, semen diambil menggunakan pipet dan diletakkan di atas slide kaca yang telah diletakkan titisan air laut. *Semen* dicampurkan di titisan air laut tersebut, dan diletakkan sisip kaca di atasnya. Pergerakan sperma boleh dilihat di bawah mikroskop.



Proses thawing dimana memasukkan sperma kryoawetan ke dalam air.



Molitili sperma dilihat dibawah mikroskop dan dinilai kadar motiliti menggunakan alat *computer assisted sperm analysis* (CASA).

Penurunan kualiti sperma, disebabkan oleh kecederaan sel berlaku selepas menggunakan prosedur *thawing* yang tidak sesuai (Tiersch & Green, 2011). Penghabluran semula ialah pembentukan kristal semasa proses *thawing*. Ia merupakan satu mekanisme kecederaan kryoawetan (Wu, 2011). Proses pencairan yang cepat adalah penting untuk mengelakkan penghabluran semula (Suquet et al., 2000). Proses penghabluran semula menyebabkan tekanan intrasel yang mengakibatkan kecederaan kryo kepada sperma. Untuk meminimumkan kecederaan kryo, prosedur pemanasan pantas mesti diamalkan (Agarwal, 2011).

Penghabluran semula air semasa proses *thawing* juga boleh membawa kematian kepada sperma (Caulter, 1992). Proses *thawing* yang cepat adalah baik kerana ia boleh menghalang penghabluran semula, namun, proses *thawing* yang perlahan juga mempunyai kelebihan di mana ia dapat mengurangkan tekanan osmotik kepada sperma (Zhu et al., 2014). Proses *thawing* pada kadar yang tinggi boleh mengganggu proses penghabluran semula ais dalaman, manakala proses *thawing* perlahan pada suhu yang lebih rendah boleh menghalang tekanan osmotik berkembang pada sperma (Zhu et al., 2014).

BAB 4: KAEDAH PENGANGKUTAN SPERMA KRYOAWETAN MENGGUNAKAN AIS KERING KERING SEBAGAI MEDIUM PENYEJUKAN

Tidak semua hatceri ikan laut di Malaysia mampu untuk memelihara induk ikan kerapu kertang jantan bagi penghasilan semen ikan bagi tujuan pembenihan ikan kerapu hybrid. Pemeliharaan induk ikan kerapu kertang melibatkan kos yang tinggi kerana belanja yang perlu dikeluarkan ialah dari aspek pemakanan yang melibatkan pemberian makanan tambahan, pengurusan mutu air di mana pertukaran air yang banyak perlu dilakukan. Terdapat hatceri yang hanya mampu memelihara induk ikan betina kerapu harimau, jadi, semen ikan kerapu kertang daripada tempat lain perlu dibawa ke hatceri tersebut. Tidak seperti di dalam industri ruminan, kryoawetan di dalam pembiakan ikan merupakan sesuatu yang baru di Malaysia. Pusat kryoawetan sperma ikan hanya terdapat di Institut Penyelidikan Perikanan atau sesetengah universiti. Oleh yang demikian, satu kaedah pengangkutan dengan kos yang murah perlu diperkenalkan untuk membolehkan sperma kryoawetan dipindahkan dari pusat kryoawetan ke hatceri yang memerlukan sperma ikan kerapu kertang bagi penghasilan benih ikan kerapu hybrid. Pengangkutan menggunakan tong liquid nitrogen memerlukan kenderaan untuk mengangkut dan tidak boleh menggunakan perkhidmatan syarikat penghantaran. Ia juga melibatkan kos yang tinggi di mana kos perlu dikeluarkan untuk cacair nitrogen, kenderaan dan juga pemandu.



Tangki besi kecil bersaiz 5 liter kapasiti yang biasa digunakan untuk mengangkut sperma kryoawetan ikan.

Ais kering

Ais kering atau dalam Bahasa Inggeris *dry ice* merupakan pepejal karbon dioksida (CO_2), yang biasa digunakan sebagai agen penyejuk. Tidak seperti ais biasa yang diperbuat daripada air, ais kering tidak cair menjadi cecair apabila ia terdedah kepada haba, sebaliknya ia berubah daripada pepejal kepada gas. Proses ini berlaku pada suhu -78.5°C (-109.3°F). Ia berbentuk seperti ais biasa tetapi biasanya berbentuk bongkah, pelet atau ketulan kecil. Ais kering jauh lebih sejuk daripada ais berasaskan air. Apabila ais kering menjadi panas, ia bertukar menjadi gas karbon dioksida. Ini menghasilkan kabut putih tebal apabila terdedah kepada kelembapan. Keadaan ini menyebabkan ia sesuai digunakan untuk kesan khas di persembahan pentas.



Bongkah ais kering

Penggunaan ais kering banyak bidang, antaranya di dalam industri pengawetan makanan. Ia digunakan secara meluas dalam aktiviti penghantaran barangan sejuk beku di mana ia dapat mengekalkan makanan pada suhu rendah tanpa gangguan ais yang mencair. Ia juga digunakan di makmal perubatan di mana ais kering digunakan untuk pembekuan cepat, memelihara sampel biologi dan untuk mengangkut bekalan perubatan yang mudah rosak seperti vaksin. Di dalam industri hiburan dan kesenian khas, ia digunakan dalam pementasan teater dan acara. Ais kering juga digunakan untuk mencipta kesan asap pada pentas. Di dalam industri kawalan makhluk perosak, ais kering digunakan sebagai kaedah pembersihan mesra alam bagi tujuan membunuh makluk perosak.

Dalam pengendalian ais kering, faktor keselamatan harus dititikberatkan. Ais kering perlu dikendalikan dengan berhati-hati. Sentuhan terus tanpa menggunakan sarung tangan khas boleh menyebabkan radang dingin.

Ia juga harus disimpan di tempat yang mempunyai pengudaraan yang baik kerana gas karbon dioksida boleh menggantikan oksigen dan berbahaya di ruangan tertutup.

Langkah-langkah Penggunaan Ais kering di dalam pengangkutan kryoawetan sperma ikan kerapu kertang.

Kaedah pengangkutan sperma kryoawetan menggunakan ais kering sebagai medium penyejukan yang dibungkus di dalam kotak *Styrofoam* merupakan kaedah yang murah kerana ia boleh menggunakan perkhidmatan syarikat penghantaran. Kos menggunakan syarikat penghantaran adalah jauh lebih murah berbanding dengan mengangkut sendiri menggunakan kenderaan. Kaedahnya sama seperti penggunaan di dalam penghantaran bahan atau spesimen perubatan yang memerlukan suhu sejuk beku. Bahan diletakkan di dalam kotak *Styrofoam* bersama ais kering, ditutup dan di *seal* dengan kemas. Antara bahan yang diperlukan untuk pengangkutan sperma ikan menggunakan ais kering sebagai medium ialah:-

- a. kryoawetan di dalam *straw* atau *cryotube*.
- b. kotak *Styrofoam* yang tebal.
- c. ais kering
- d. pita pelekat

Kaedah Pembungkusan

Peringkat awal pengangkutan ialah pemilihan kotak styrofoam yang akan digunakan untuk pembungkusan. Kotak yang tebal dan kuat perlu dipilih kerana ais kering adalah berbahaya jika berlakukan kebocoran kepada kotak. Di pasaran Malaysia, terdapat kotak Styrofoam yang mempunyai keluasan dalaman 8,487.00 cm³. Ketebalan kotak ialah 3.7 cm di mana ia cukup kuat untuk menampung beban yang kuat.



Kotak *Styrofoam* yang bersaiz 8487 cm³ dan ketebalan 3.7 cm yang sesuai digunakan untuk pembungkusan sperma kryoawetan.

Penyediaan ais kering

Ais kering perlu diperolehi daripada pihak pembekal semasa kerja-kerja pembungkusan akan dilakukan. Kilang pengeluaran ais kering hanya terdapat di Nilai, Negeri Sembilan. Jika pusat kryoawetan terletak jauh daripada tempat pengeluaran ais kering, pembekal perlu membuat penghantaran sehari sebelum kerja-kerja dilakukan. Biasanya ais

kering dihantar menggunakan perkhidmatan syarikat penghantaran dan tempoh perjalanan biasanya mengambil masa 24 jam. Ais kering boleh kehilangan isipadu semasa proses penghantaran dari pembekal kepada penerima. Oleh itu keperluan ais perlu ditentukan. Daripada kajian yang dijalankan oleh Che_Zulkifli et al.,(2020b), bagi menyejukkan suhu udara di dalam kotak Styrofoam yang bersaiz 8487 cm³ kepada -61.83 ± 0.50 °C, sebanyak 6.3 kg ais kering perlu dimasukkan ke dalam kotak. Dianggarkan sebanyak 30 % berat ais kering akan hilang semasa proses penghantaran, maka kita boleh menganggarkan berat ais kering yang perlu diperolehi daripada pihak pembekal. Setelah menerima ais kering daripada pihak pembekal, ia perlu dimasukkan segera ke dalam kotak styrofoam yang akan digunakan untuk penghantaran. Sebelum memasukkan ais kering ke dalam kotak, ia perlu ditimbang mengikut cadangan seperti kajian diatas.

Pemindahan sperma kryoawetan daripada tangki liquid nitrogen ke kotak Styrofoam

Sperma kryoawetan yang disimpan di tangki cecair nitrogen akan dikeluarkan secara pantas daripada tangki dan dimasukkan ke dalam kotak styrofoam. *Forcep* digunakan untuk mengambil sperma yang diletakkan sama ada di dalam *straw* atau *cryotube* daripada *canister* atau *bracket*. Proses ini perlu dilakukan secara pantas bagi mengelakkan sperma terdedah lama di dalam udara biasa. Setelah sperma kryoawetan dimasukkan ke dalam kotak, ia segera ditutup menggunakan penutup dan di *seal* menggunakan pelakat pita. Bagi

mengelakkan ais kering terpeluap keluar, kotak perlu diseal/ dengan baik menggunakan pita pelekat. Setelah itu, bungkusan boleh segera di hantar menggunakan syarikat penghantaran ke tempat yang hendak di tuju.



Pemindahan sperma kryowetan daripada tangki simpanan cecair *nitrogen* ke dalam kotak Styrofoam yang mengandungi ais kering.



Kotak styroam yang mengandungi sperma kryowetan dan ais kering yang telah di seal/ dengan pita pelekat untuk tujuan penghantaran.

BAB 5 : KAEDAH PENGHASILAN BENIH KERAPU HIBRID MENGGUNAKAN SPERMA KRYOAWETAN.

Pengurusan Induk Kerapu Harimau

Kerapu hybrid yang terkenal di Malaysia dan juga di negara ASEAN ialah kacukan antara induk jantan ikan kerapu kertang dan juga induk betina ikan kerapu harimau. Jika menggunakan semen segar bagi penghasilan kerapu hybrid, induk kerapu kertang juga perlu diuruskan dengan baik bagi menghasilkan sperma yang berkualiti. Jika sesebuah hatceri menggunakan sperma kryoawetan bagi penghasilan kerapu hybrid, maka pengurusan induk hanya tertumpu kepada induk kerapu harimau sahaja. Sperma ikan kerapu kertang boleh diperolehi daripada pusat kryoawetan yang menyimpan sperma tersebut dan penghantaran boleh dilakukan mengikut cara seperti yang dicadangkan di dalam bab yang sebelum ini. Jenis pengurusan induk ialah pengurusan mutu air dan juga pemakanan yang melibatkan makanan harian dan juga makanan tambahan bagi merangsang perkembangan gonad.

Pengurusan air

Pengurusan mutu air adalah sangat penting bagi kesejahteraan ikan. Ikan yang berada di dalam air yang berkualiti rendah akan berada di dalam tekanan. Ikan yang berada di dalam tekanan biasanya tidak ada selera makan. Ikan yang lapar mudah diserang penyakit yang akan

menyebabkan kematian. Air juga perlu ditapis menggunakan penapis fizikal seperti penapis pasir dan juga *filter bag* yang bersaiz 10 μm bagi tujuan menapis keladak lumpur daripada masuk ke tangki ternakan induk. Bagi ternakan induk, rawatan air menggunakan bahan kimia seperti klorin adalah tidak disyorkan kerana pertukaran air yang banyak diperlukan. Memadai dengan memasukkan air yang bertapis sahaja.

Pemakanan induk

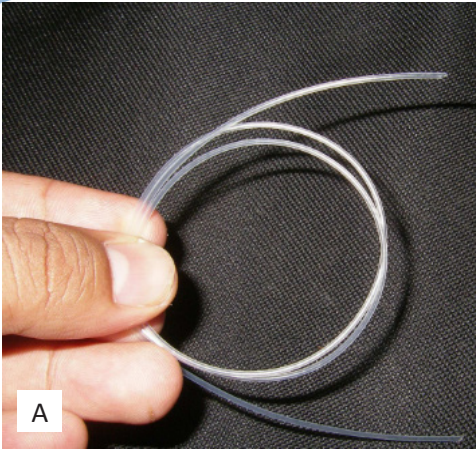
Pengurusan pemakanan induk kerapu harimau adalah sangat penting bagi menjamin kualiti telur yang dihasilkan. Induk ikan biasanya diberi makan ikan segar dari jenis ikan kembong atau ikan lain. Pemberian makanan diberi sekali sehari pada kadar 5% daripada berat badan. Contohnya, jika berat keseluruhan induk ikan itu 100 kg, maka sebanyak 5 kg ikan perlu diberi makan kepada induk. Selain makanan harian, induk ikan juga perlu diberi makanan tambahan seperti vitamin. Antara vitamin yang diberi kepada induk ikan ialah vitamin campuran dan juga vitamin E. Selain dari vitamin, minyak sotong dan juga minyak ikan boleh diberi sebagai makanan tambahan. Cara pemerian makanan tambahan kepada induk ikan ialah dengan memasukkan vitamin atau minyak ikan ke dalam kapsul kosong dan memasukkan kapsul tersebut ke dalam mulut ikan segar yang akan diberi makan kepada induk ikan. Selain itu, minyak ikan atau minyak sotong boleh disuntik kedalam tisu ikan segar sebelum diberi makan kepada induk ikan. Makanan tambahan yang mengandungi *Eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *Docosahexaenoic acid*

(DHA) akan merangsang perkembangan gonad bagi pementukan telur yang matang dan berkualiti. Perkembangan gonad akan diperiksa pada masa ke semasa bagi menentukan masa yang sesuai untuk proses pembiakan.

Kaedah Pembiakan Aruhan

Pemeriksaan status telur

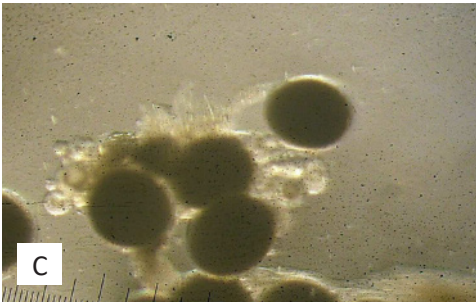
Status gonad ikan diperiksa dengan cara memasukkan tiub plastik lembut yang berdiameter 0.2 cm ke dalam salur pembiakan ikan. Pensampelan telur ikan boleh dilakukan dengan cara menyedut tiub plastik tersebut supaya telur tertarik masuk ke dalam tiub. Saiz telur akan diperiksa di bawah mikroskop dan diukur saiz diameter. Jika diameter telur lebih dari 0.5 mm, maka proses pembiakan boleh dilakukan di mana status gonad adalah berada di peringkat 4(matang).



A



B



C

A: Tiub plastik yang berongga yang digunakan untuk pensampelan telur ikan.

B: Proses pensampelan telur dari induk ikan

C: Telur ikan yang dikeluarkan daripada alat pensampelan

Suntikan hormon untuk merangsang perkembangan ovari

Peringkat pertama proses pembiakan aruhan ikan ialah suntikan hormon. Beberapa jenis hormone boleh diperolehi di pasaran tempatan atau antarabangsa. Suntikan hormone kepada induk betina adalah bertujuan merangsang perkembangan gonad dan pelepasan telur ikan. Beberapa jenis hormone yang digunakan untuk pembiakan ikan dan diantaranya ialah *Gonadotropin-Releasing Hormones (GnRH)*. Penggunaannya adalah bertujuan untuk merangsang pengeluaran hormon *gonadotropin* yang boleh menggalakkan perkembangan gonad sama ada gonad jantan (spermatogenesis) atau gonad betina (oogenesis).

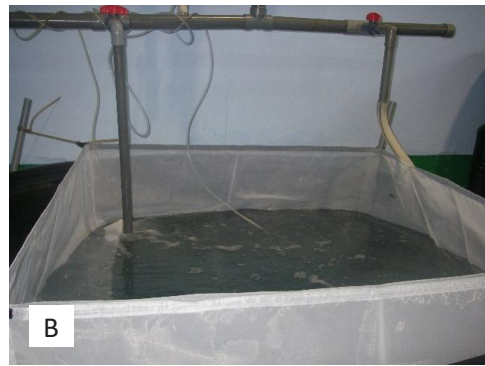


Hormon GnRH jenis pellet diimplan ke dalam badan induk ikan bagi tujuan merangsang perkembangan gonad.

Di dalam proses penghasilan benih ikan kerapu hibrid, hormon akan disuntik kepada induk betina Kerapu Harimau. Dos suntikan ialah 1000 IU bagi sekilogram berat ikan. Jadi, jika berat induk ikan ialah 5 kg, dos hormone GnRH yang perlu disuntik ke atas induk itu ialah 5000 IU. Selain GnRH, hormone yang biasa digunakan di dalam pembiakan ikan laut ialah *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) analogs*. Peranannya sama seperti GnRH iaitu merangsang perkembangan gonad. Terdapat sejenis lagi hormon yang digunakan di dalam pembiakan ikan iaitu *Human Chorionic Gonadotropin (hCG)*. Ia berperanan untuk merangsang perkembangan telur dan sperma pada peringkat akhir kematangan.

Peleretan telur

Biasanya telur ikan boleh diperah daripada gonadnya selepas 48 jam suntikan hormone. Pemeriksaan fizikal boleh dilakukan dengan cara pemerhatian terhadap bahagian abdomen ikan. Telur boleh diperah apabila abdomennya membengkak dan lembut apabila disentuh. Bagi mengelakkan *stress* pada induk ikan, ia perlu ditidurkan dengan memasukkan bahan pelali seperti sebatian minyak cengkih ke dalam air. Apabila ikan telah pangsang, Telur ikan diperah dengan cara menekan secara lembut pada bahagian abdomen ikan menuju ke bahagian bukar salur pembiakan. Jika telur yang telah cukup matang, ia akan keluar dengan mudah ke dalam bekas yang diletakkan di bahagian bawah.

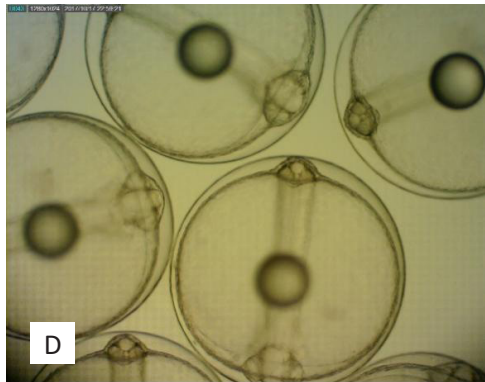
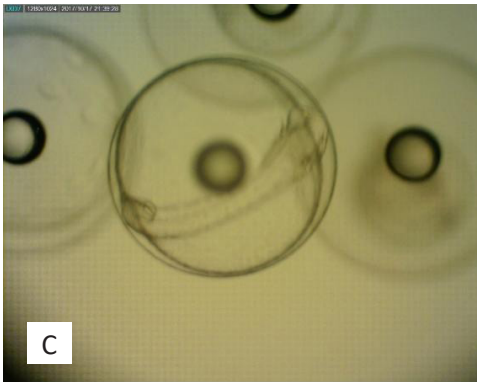


A: Proses meleret telur dari *abdomen* induk ikan kerapu harimau

B: Telur yang telah dicampurkan dengan sperma ikan kerapu kertang dimasukkan ke dalam tangki berisi air laut. Hapa diletakkan bagi memudahkan pemungutan larva ikan.

Penyediaan sperma kryoawetan

Sperma kryowetan dikeluarkan daripada kotak Styrofoam yang dihantar daripada pusat kryoawetan dan dimasukkan ke dalam bekas berisi air bagi proses *thawing*. Setelah 30 saat, *straw* dipotong atau *cryotube* dibuka dan sperma dituang ke dalam telur ikan. Bulu ayam digunakan untuk menggaul campuran telur kerapu harimau dan sperma ikan kerapu kertang. Proses pencampuran dibiarkan selama 15 minit. Kemudian, ia dibilas menggunakan air laut dengan memasukkan telur ke dalam penapis dan dicurahkan air laut untuk bilasan. Kemudian telur dimasukkan ke dalam air laut bertapis bagi penetasan. Air laut yang ditambah garam tiruan sehingga 35 ppt adalah yang terbaik bagi kadar penetasan yang tinggi. Kebiasaannya telur akan menetas selepas 36 jam.



- A: Telur yang tersenyawa
- B: Telur yang tidak tersenyawa
- C: Persenyawaan selepas 12 jam
- D: Persenyawaan selepas 14 jam
- E: Persenyawaan selepas 19 jam
- F: Larva ikan kerapu hybrid yang baru menetas.

Ternakan larva sehingga saiz benih

Larva ikan kerapu hibrid ditenak di dalam tangki gentian kaca atau tangki konkrit dengan kapasiti air 10 hingga 50 ton air laut. Kepadatan yang biasanya dimasukkan ialah antara 10-30 larva/liter air laut. Saliniti air laut yang sesuai adalah antara 30-35 ppt. Jika air laut tidak cukup masin, garam diperlukan untuk meningkatkan kemasinan air laut. Saliniti air laut yang tinggi diperlukan pada peringkat awal ternakan larva. Pengudaraan adalah secara perlahan bagi mengelakkan tekanan kepada larva ikan. Makanan awalan larva ikan ialah alga hijau *Nannochloropsis sp.* Ia perlu dimasukkan sebelum larva dimasukkan ke dalam tangki. Pada hari kedua, makanan hidup (zooplankton) iaitu rotifer perlu dimasukkan ke dalam tangki. Artemia perlu dimasukkan ke dalam tangki pada hari ke 15 ternakan. Makanan rumusan juga perlu diberi kepada larva ikan pada hari ke 10. Makanan perlu dipastikan mencukupi untuk benih ikan kerana larva ikan ibarat bayi yang sentiasa perlukan makanan apabila ia lapar. Larva ikan akan mati apabila tiada makanan apabila ia memerlukan.



Benih ikan kerapu hibrid yang bersaiz 3 inci yang dihasilkan di hatceri.

Pengurusan air tangki ternakan perlu dijalankan bagi menjaga kualiti air. Antara aktiviti pengurusan air yang perlu dilakukan ialah pertukaran air dan juga *siphoning* dasar tangki bagi mengeluarkan lebihan makanan dan juga najis benih ikan. Pengurusan air yang kurang baik akan meningkatkan paras ammonia di dalam air yang toksik kepada benih ikan. Jadual berikut adalah cadangan aktiviti di dalam ternakan larva ikan kerapu hybrid.

yang telah dibincangkan di dalam bab terdahulu. Pemeliharaan induk jantan kerapu kertang melibatkan kos yang tinggi di mana ia melibatkan kos ruang, kakitangan, makanan segar dan juga makanan tambahan. Pengurusan air juga melibatkan kos yang tinggi di mana aliran terus perlu dilakukan yang melibatkan kos elektrik mengepam air laut dan juga sistem penapisan.

Kaedah ini juga diamalkan di dalam industri ternakan ruminan di mana bagi proses pernianian beradas bagi menghasilkan strain lembu yang bersaiz besar perlu menggunakan sperma kryoawetan yang dibekalkan oleh pihak Jabatan Veterinar. Pusat Kryoawetan sperma lembu yang berpusat di Jerantut, Pahang akan menghantar sperma kryoawetan ke negeri-negeri yang memerlukan bagi tujuan proses pernianian beradas. Dengan kaedah ini, banyak anak lembu yang berkualiti tinggi yang mempunyai saiz yang besar dapat hasilkan bagi mengembangkan hasil pengeluaran di dalam industri lembu pedaging atau tenusu.

Sama seperti industri ruminan, industri penghasilan benih kerapu hibrid boleh menggunakan kaedah ini bagi memperbanyakkan penghasilan benih ikan kerapu hidrid bagi memenuhi permintaan penternak ikan dalam sangkar laut. Dengan ini import benih ikan kerapu hibrid dari luar negara terutamanya dari Indonesia dapat dikurangkan. Dengan kejayaan pengusaha hatceri menghasilkan benih kerapu hibrid menggunakan sperma kryoawetan diharapkan dapat memperkembangkan lagi industri akuakultur marin di Malaysia.

RUJUKAN

- Agarwal, N. K. (2011). Cryopreservation of Fish Semen. In *Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology*. 104-127 pp.
- Alavi, S. M. H., Hatef, A., Pšenička, M., Kašpar, V., Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Linhart, O. (2012). Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 22(4), 861-886.
- Alavi, S. M. H., Kozak, P., Hatef, a, Hamackova, J., & Linhart, O. (2010). Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba L.* and the effects of osmolality on sperm motility. *Theriogenology*, 74(2), 317–25.
- Bhavani, C. N., Noble, D., Gopalakrishnan, A., & Sanil, N. K. (2003). Cryopreservation of spermatozoa in the mullet , *Liza parsia* : Effect of *Cryoprotectants* on morphology and motility. *I. Mar. Biol. Ass. India*, 45(1), 38–46.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez-Paramo, Robles, V., Beirao, J., Perez-Cerezales, S., & Herraez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*. 26(5), 623-635.
- Caulter, G. H. (1992). Bovine Spermatozoa in vitro: A review of storage, fertility estimation and manipulation. *Theriogenology*, 38, 197–207.
- Che-Zulkifli, C. I., Koh, I. C. C., Shahreza, M. S., & Ikhwanuddin, M. (2020a). Cryopreservation of spermatozoa on grouper species: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 26-32.
- Che-Zulkifli, C. I., Ivan Chong Chu, K., Mustafa, S., Md Sheriff, S., & Ikhwanuddin, M. (2020b). Use of dry ice for the shipping and packaging of cryopreserved giant grouper *Epinephelus lanceolatus* spermatozoa. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.002>
- Cuevas-Uribe, R. (2011). *A General Approach For Vitrification Of Fish Sperm*. Louisiana State University. USA. 256 pp.

- Gallego, V., Pérez, L., Asturiano, J. F., & Yoshida, M. (2013). Study of pufferfish (*Takifugu niphobles*) sperm: Development of methods for short-term storage, effects of different activation media and role of intracellular changes in Ca²⁺ and K⁺ in the initiation of sperm motility. *Aquaculture*, 414–415, 82–91.
- Gwo, J. C. (1993). Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39(6), 1331-1342.
- Fan, B., Liu, X. C., Meng, Z. N., Tan, B. H., Wang, L., Zhang, H. F., ... & Lin, H. R. (2014). Cryopreservation of giant grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch, 1790) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(2), 334-339.
- Jamieson, B. G. M. (2009). *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Queensland: Science Publisher.
- Kiriyakit, A., Gallardo, W. G., & Bart, A. N. (2011). Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides* x *Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 320(1–2), 106–112.
- Koh, I. C. C., Yokoi, K.-I., Tsuji, M., Tsuchihashi, Y., & Ohta, H. (2010). Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology*, 61(3), 263–7.
- Kulaksiz, R., Çebî, Ç., & Akçay, E. (2012). The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 ° C. *Turk J Vet Anim Sci*, 36(2), 177–182.
- Lim, H. K., & Le, M. H. (2013). Evaluation of extenders and *Cryoprotectants* on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm. *Theriogenology*, 79(5), 867–71.
- Lin, Y. H., & Shiau, S. Y. (2005). Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. *Aquaculture*, 248(1–4), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.020>
- Liu, Q. H., Xiao, Z. Z., Wang, X. Y., Xu, S. H., Guan, S. G., Xu, C. A., Li, J. (2016). Sperm cryopreservation in different grouper subspecies and application in interspecific hybridization. *Theriogenology*, 85(8), 1399–1407.
- Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T. R., & Cabrita, E. (2017). Cryobanking of aquatic species.

Aquaculture, 472(October), 156–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>

- Paasch, U., Sharma, R. K., Gupta, A. K., Grunewald, S., Mascha, E. J., Thomas, A. J., Agarwal, A. (2004). Cryopreservation and *thawing* is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71, 1828–1837.
- Silva, C. G., Cunha, E. R., Blume, G. R., Malaquias, J. V., & Martins, C. F. (2015). Cryopreservation of boar sperm comparing different *Cryoprotectants* associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*, 70(2), 90–94.
- Soylu, M. K., Nur, Z., Ustuner, B., & Dogan, I. (2007). Effects of Various Cryoprotective Agents and Extender Osmolality on Post-Thawed Ram Semen. *Bull Vet Inst Pulawy*, 241–246.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., & Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31, 231–243.
- Tian, Y., Qi, W., Jiang, J., Wang, N., Wang, D., Zhai, J., Chen, S. (2013). Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Animal Reproduction Science*, 137, 230–236.
- Tiersch, T. R. and C. C. Green, editors. (2011). Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd Edition. *World Aquaculture Society*. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S., & Nimrat, S. (2009). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of *Cryoprotectants* and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology*, 72, 129–138.
- Wu, L. (2011). Ice recrystallization inhibition as a mechanism for reducing cryopreservation injury in a hematopoietic stem cell model. University of Ottawa.
- Zhu, W., Li, X., Qu, D., Liu, Y., & Clarke, S. (2014). Cryopreservation of sperm from wild greenlip abalone (*Haliotis laevis*) in Australia. *Aquaculture*, 432, 60–66.

DAFTAR ISTILAH

NaHCO_3 - Sodium bicarbonate

NaCl - Natrium Chlorida

KHCO_3 - Potassium bicarbonate

KCl - Kalium Klorida

CaCl - Kalsium Chlorida

NaCl - Natrium klorida

MgCl - Magnesium Klorida

NaHCO_3 - Natrium Hidrogen Karbonat

EPA- Eicosapentaenoic acid

DHA- Docosahexaenoic acid

GnRH- Gonadotropin Releasing hormone

hCG- Human chorionic gonadotropin

LhRH- Luteinizing hormone-releasing hormone

DMSO- Dimethylsulfoxide



KEMENTERIAN PERTANIAN DAN
KETERJAMINAN MAKANAN



*"Jabatan Perikanan
Malaysia"*

INSTITUT PENYELIDIKAN PERIKANAN

ISBN 978-967-2946-52-6



9 789672 946526

MANUAL KRYDAWETAN SPERMA IKAN KERAPU KERTANG
(*Epinephelus lanceolatus*)