

**KAJIAN PERBANDINGAN PENERAPAN METODE EKSPONENSIAL DAN
SQUARE WAVE DALAM ELEKTROPORASI SPERMA IKAN
LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh :
HADI SUCANDRA
NIM. 0610850034



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG
2010**

Created with



nitro PDF[®]

professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional



**KAJIAN PERBANDINGAN PENGARUH METODE EKSPONENSIAL DAN
SQUARE WAVE DALAM ELEKTROPORASI SPERMA IKAN
LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)**

*Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Pada
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang*

Oleh :
HADI SUCANDRA
0610850034

DOSEN PENGUJI I

(Dr. Ir. AGOES SOEPRIJANTO, MS)

NIP. 19590807 198601 1 001

TANGGAL :

DOSEN PENGUJI II

(Ir. PRAPTI SUNARMI)

NIP. 19520131 198003 2 001

TANGGAL :

**MENYETUJUI,
DOSEN PEMBIMBING I**

(Ir. ABDUL RAHEM FAQIH, MSi)

NIP. 19671010 199702 1 001

TANGGAL :

DOSEN PEMBIMBING II

(Ir. PURWOHADIJANTO)

NIP. 19480920 198103 1 001

TANGGAL :

**MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN**

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

TANGGAL :

Created with

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT. atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan. Laporan skripsi yang berjudul Kajian Perbandingan Penerapan Metode Ekspensial Dan Square Wave Dalam Elektroporasi Sperma Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan dan ilmu kelautan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Di dalam tulisan ini disajikan pokok – pokok bahasan mengenai elektroporasi, metode ekspensial dan square wave, motilitas sperma, dan viabilitas sperma. Tulisan ini juga menjelaskan pengaruh penggunaan dua metode yang berbeda (ekspensial dan square wave) dalam elektroporasi sperma.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih banyak memiliki kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari pembaca guna kesempurnaan laporan ini. Akhir kata, penulis berharap semoga laporan skripsi ini dapat banyak berguna dan bermanfaat bagi pembaca pada umumnya serta bisa menjadi sumber informasi untuk penelitian berikutnya.

Malang, November 2010

Penulis

Created with



nitro PDF[®]

professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional



RINGKASAN

HADI SUCANDRA. Kajian Perbandingan Penerapan Metode Eksponensial Dan Square Wave Dalam Elektroporasi Sperma Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). (di bawah bimbingan Ir. **ABDUL RAHEM FAQIH, MSi.** dan Ir. **PURWOHADIJANTO**).

Elektroporasi adalah proses penerapan medan listrik untuk sel hidup dalam jangka waktu yang singkat dan memungkinkan pembentukan pori - pori pada molekul eksogen seperti DNA sehingga memungkinkan juga untuk masuk ke dalam sel. Elektroporasi memiliki dua metode, yaitu *Eksponensial Wave* dan *Square Wave*. Dua jenis kejutan listrik yang berbeda yaitu *Square wave* dan *Exponential wave* telah digunakan dalam mentransfer gen ke dalam sperma ikan. Tegangan dari *Square wave* lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol. Sedangkan *Exponential wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh beda metode (*Square wave dan Eksponensial*) terhadap pergerakan (motilitas) dan kemampuan hidup (viabilitas) sperma ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), selain itu juga untuk mengetahui lebih baik mana penggunaan antara dua metode tersebut dalam elektroporasi. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan (Laboratorium Breeding) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, mulai bulan Juni sampai dengan Agustus.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan dua perlakuan yang masing-masing perlakuannya diulang sebanyak tiga kali dan kontrol diberikan pada semua perlakuan yang fungsinya untuk membandingkan dengan perlakuan. Sebagai perlakuan adalah A = pemberian kejutan listrik dengan metode *Eksponensial Wave* menggunakan parameter ukur tegangan (40 v); perlakuan B = pemberian kejutan listrik dengan metode *Square Wave* menggunakan parameter ukur tegangan (40 v). Dari uji statistik didapatkan bahwa perlakuan perbedaan dua metode berbeda sangat nyata, dengan $F \text{ hitung} > F 1\%$.

Parameter uji yang dilakukan dalam penelitian ini adalah motilitas dan viabilitas spermatozoa. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa pemberian kejutan listrik dengan menggunakan metode *Square Wave* memiliki nilai persentase viabilitas dan motilitas yang lebih tinggi daripada penggunaan metode *Eksponensial Wave*. Persentase motilitas pada penggunaan metode *Square Wave* sebesar 26,6% dan persentase viabilitas sebesar 63,16%. Sedangkan pada penggunaan metode *Eksponensial Wave* memiliki persentase motilitas sebesar 5% dan viabilitas sebesar 12,5%. Dari hasil penelitian ini dapat disarankan bahwa elektroporasi pada sperma ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) sebagai media transfer gen sebaiknya dilakukan dengan menggunakan metode *Square Wave*.

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	4
1.6 Tempat dan Waktu	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Ikan Lele Dumbo	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	6
2.1.3 Daerah Penyebaran	6
2.1.4 Siklus Reproduksi	7
2.2 Ciri-ciri Induk Ikan Lele Dumbo yang Telah Matang Gonad	8
2.2.1 Induk Jantan	8
2.3 Spermatozoa dan Proses Spermatogenesis	8
2.3.1 Pengambilan Sperma Ikan Lele Dumbo	10
2.3.2 Stabilisasi Kondisi Sperma	10
2.3.3 Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa	12
2.4 Pengaruh Kejut Listrik Pada Sel Sperma	14
2.5 Hubungan Motilitas dan Viabilitas Sperma	15
2.6 Metode Elektroporasi	16
2.7 Elektroporasi Sperma	21
III. MATERI DAN METODE	23
3.1 Materi Penelitian	23
3.1.1 Bahan	23
3.1.2 Alat	22
3.2 Metode Penelitian	25
3.3 Rancangan Penelitian	25
3.4 Prosedur Penelitian	26

3.4.1 Persiapan Penelitian 26

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian 28

3.5 Parameter Uji Penelitian 29

3.5.1 Motilitas Spermatozoa 29

 3.5.1.1 Cara Penghitungan Persentase Motilitas 31

3.5.2 Viabilitas Spermatozoa 31

 3.5.2.1 Cara Penghitungan Persentase Motilitas 33

3.6 Analisa Data 33

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 32

4.1 Kualitas Sperma Kontrol 32

 4.1.1 Motilitas Sperma 33

 4.1.2 Viabilitas Sperma 35

4.2 Kualitas Sperma Elektroporasi 39

 4.2.1 Metode Square Wave 39

 4.2.2 Metode Eksponensial Wave 41

 4.2.3 Perbandingan Metode Square Wave dan Eksponensial Wave 43

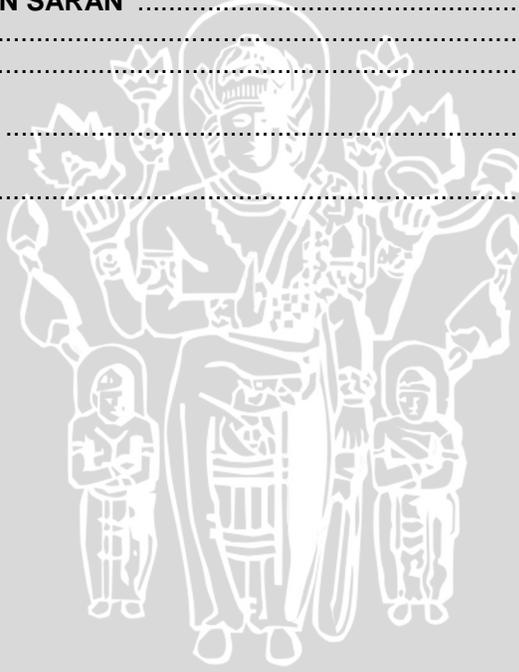
V. KESIMPULAN DAN SARAN 45

5.1 Kesimpulan 45

5.2 Saran 45

DAFTAR PUSTAKA 46

LAMPIRAN 50



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Elektroporasi adalah proses penerapan medan listrik terhadap sel hidup dalam jangka waktu yang singkat. Elektroporasi memungkinkan pembentukan pori-pori sehingga molekul eksogen seperti DNA dapat masuk ke dalam sel. Elektroporasi merupakan teknik yang sangat efisien untuk memasukkan asam nukleat, protein, karbohidrat, RNA, pewarna, partikel virus dan molekul lain dalam berbagai macam sel seperti prokariotik dan eukariotik (Anonymous, 2006).

Metode elektroporasi menggunakan serangkaian listrik arus pendek untuk melemahkan membran sel guna membantu DNA rekombinan masuk ke dalam sel tertentu. Pada umumnya metode elektroporasi digunakan untuk transfer gen pada bakteri *yeast*, tanaman-tanaman dan sel-sel hewan (Chent, 1995). Menurut Weaver (1993) perubahan di dalam suatu sel permeabel oleh suatu medan elektrik disebut elektroporasi. Elektroporasi telah digunakan untuk memindahkan makromolekul seperti DNA dan protein ke dalam sel tumbuhan, sel hewan dan sel bakteri.

Elektroporasi memfasilitasi terbentuknya pori-pori temporal pada permukaan membran sel target (Smarsik *et al.*, 2002). Ditambahkan oleh Inoue *et al.* (1990) dalam Hackett (1993) metode elektroporasi adalah suatu metode yang berhasil dalam transfer gen pada sel jaringan yang dikultur. Dan metode ini pada tahun 1990 dianggap metode terbesar yang berhasil dalam transgenik ikan. Sel membuka saat diberi kejutan listrik, molekul yang menyusun membran sel itu menjadi berubah dan suatu tegangan potensial terjadi melewati membran. Dimana perbedaan potensial melebihi suatu tingkat pembukaan pintu antara bagian dalam dan bagian luar dari membran sel, kemudian membran pecah dan membentuk pori-pori, dengan begitu molekul membiarkan difusi dari *exogenous* ke dalam sel (Knight, 1981).

Transfer gen pada ikan dengan menggunakan metode elektroporasi dengan sperma ikan sebagai media transfer gen masih belum dilak

Created with

Padahal Kang, Goro, Osamu, Charlos, Strusmann dan Fumio (1999) menyatakan bahwa sel sperma dapat digunakan sebagai media untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel telur. Sperma adalah sel-sel spermatozoa yang berada dalam larutan seminal dan dihasilkan oleh hidrasi testes, atau salah satu bagian dari alat reproduksi ikan (Ari, 2008). Sperma sebagai media transfer gen sangat potensi dikembangkan dalam transgenik ikan karena prosedurnya yang relatif alami dan lebih efisien (Sin *et al.*, 2008). Kemudian Lavitrano *et al.* (2006) menyatakan sperma memiliki kelebihan sebagai media transfer gen, karena dalam mentransfer materi genetik, sperma menggunakan vektor yang relatif alami. Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen pada ikan mas, lele dan nila (Muller *et al.*, 1992).

Metode elektroporasi yang umum digunakan untuk menghasilkan kondisi yang optimal terbukti memakan waktu. Dengan diperkenalkannya *Gene Pulser* sistem elektroporasi kondisi optimal dapat ditentukan dengan cepat. *Gene Pulser* adalah sistem elektroporasi modular, yang mencakup unit utama, memiliki 2 modul aksesori (modul CE dan modul PC). Modul CE (*Cell Eukariotic*) digunakan untuk media yang memiliki hambatan rendah (<1000 ohms) dan tegangan yang rendah. Pada tegangan *eksponensial*, modul CE berfungsi mengontrol kapasitas selama bertambahnya lama kejutan yang konstan atau stabil. Sedangkan pada tegangan *Square wave* memberikan kebutuhan kapasitas yang besar (3275 μF) untuk mengirim kejutan *square wave* dalam media yang memiliki hambatan rendah.

PC (*Prokariotic Cell*) modul dibutuhkan untuk elektroporasi tegangan tinggi. PC modul digunakan untuk hambatan 50 ohms – 1000 ohms dalam setiap kenaikan 50 ohm. Modul ini efektif untuk mengontrol konstannya waktu ketika digunakan hambatan tinggi, akan tetapi memiliki efek yang sedikit pada pengontrolan konstannya waktu ketika digunakan pada hambatan rendah.

Modul CE digunakan untuk elektroporasi sel eukariotik, termasuk sel mamalia dan protoplas tanaman. Sedangkan modul PC digunakan

bakteri dan jamur serta aplikasi lain dimana pulsa tegangan tinggi diterapkan pada sampel volume kecil dan ketahanan tinggi. Sistem *Gene Pulser* menghasilkan bentuk gelombang *eksponensial* dan persegi (*square*) yang memungkinkan untuk memilih gelombang yang terbaik untuk proses elektroporasi. Baik secara *eksponensial* maupun *square* telah digunakan dengan sangat efektif untuk elektroporasi. Bentuk gelombang elektroporasi dapat memiliki dampak yang signifikan terhadap efisiensi transformasi untuk tipe sel yang berbeda (Anonymous, 2006).

Dua jenis kejutan listrik yang berbeda yaitu *Square wave* dan *Exponential wave* telah digunakan dalam mentransfer gen ke dalam sperma ikan. Tegangan dari *Square wave* lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol. Sedangkan *Exponential wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen (berkelanjutan) (Muller *et al.*, 1992).

1.2 Perumusan Masalah

Dalam usaha budidaya ikan khususnya ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), pemijahan merupakan sebuah kegiatan yang sangat penting. Dalam pemijahan, sperma dari ikan jantan sangat menentukan tinggi rendahnya pembuahan. Kualitas sperma salah satunya dapat ditentukan dari tingkat motilitas dan viabilitas sperma itu sendiri. Metode *Eksponensial* dan *Square Wave* dalam elektroporasi dapat mempengaruhi tingkat motilitas dan viabilitas sperma. Berdasarkan hal-hal tersebut maka timbul beberapa pertanyaan, yaitu:

- Apakah aplikasi metode *Eksponensial* dan *Square Wave* berpengaruh terhadap viabilitas dan motilitas sperma ikan lele dumbo?
- Dari dua metode yang dilakukan, metode mana yang lebih baik terhadap tingkat motilitas dan viabilitas sperma ikan lele dumbo?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh beda metode (*Square wave* dan *Ekspensial*) terhadap pergerakan (motilitas) dan kemampuan hidup (viabilitas) sperma ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), selain itu juga untuk mengetahui lebih baik mana penggunaan antara dua metode tersebut dalam elektroporasi.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan dapat dijadikan sumber informasi mengenai pengaruh pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan lele dumbo serta dalam mendukung pembuatan ikan transgenik.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*).

H_1 : Diduga pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*).

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan (Laboratorium *Breeding*) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, dimulai pada bulan Juni sampai dengan Agustus.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi ikan lele dumbbo secara sistematis menurut Saanin (1984) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Subkingdom	: Metazoa
Phyllum	: Chordata
Subphyllum	: Vertebrata
Class	: Pisces
Subclass	: Teleostei
Ordo	: Ostariophysoidei
Subordo	: Siluroidea
Family	: Claridae
Genus	: Clarias
Spesies	: <i>Clarias gariepinus</i>



Gambar 1. Ikan Lele Dumbo (Koleksi foto sendiri)

Created with



nitro PDF

professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

2.1.2 Morfologi

Sebagaimana halnya ikan dari jenis lele, lele dumbo memiliki kulit tubuh yang licin, berlerndir, dan tidak bersisik. Mulut lele dumbo relatif lebar, yaitu sekitar $\frac{1}{4}$ dari panjang total tubuhnya. Tanda spesifik lainnya dari lele dumbo adalah adanya kumis di sekitar mulut sebanyak 8 buah yang berfungsi sebagai alat peraba saat bergerak atau mencari makan (Khairuman, 2008).

Ikan lele dumbo memiliki lima sirip, yaitu : sirip punggung, sirip dada, sirip perut, sirip dubur dan sirip ekor. Pada sirip dada jari-jari pertamanya mengeras yang berfungsi sebagai patil tetapi pada lele dumbo lemah dan tidak beracun. Insang berukuran kecil, sehingga kesulitan jika bernafas. Selain bernafas dengan insang ikan lele dumbo juga memiliki alat pernafasan tambahan (*arborecent*) yang terletak pada rongga insang bagian atas (Najiyati, 1992).

Ciri-ciri induk jantan ikan lele dumbo menurut Khairuman (2008) :

- Kepalanya lebih kecil dari induk ikan lele betina.
- Warna kulit dada agak tua bila dibanding induk ikan lele betina.
- Urogenital papilla (kelamin) agak menonjol, memanjang ke arah belakang, terletak di belakang anus dan warna kemerahan.
- Gerakannya lincah, tulang kepala pendek dan agak gepeng (Depress).
- Kulit lebih halus dibanding induk ikan lele betina.
- Perutnya lebih langsing bila dibanding induk ikan lele betina.

2.1.3 Daerah Penyebaran (Habitat)

Ikan lele dapat ditemukan pada hampir semua perairan tawar. Misalnya saja di danau, waduk, sungai, genangan air dan rawa. Di sungai ikan ini lebih banyak dijumpai pada tempat-tempat yang alirannya tidak terlalu deras. Pada tempat kelokan air sungai yang aliran arusnya lambat ikan lele sering kali tertangkap (Susanto, 1988).

Ikan lele tersebar luas di benua Afrika dan Asia, terdapat di perairan umum yang berair tawar. Dibeberapa Negara khususnya di Asia, ikan lele telah ditenakkan, dipelihara di kolam. Seperti halnya terjadi di Filipina, Thailand, Indonesia, Laos, Vietnam, Birma dan India. Di Indonesia ikan lele ini secara alami terdapat di Kepulauan Sunda Besar maupun Sunda Kecil (Suyanto, 2006).

Suhu yang cocok untuk memelihara lele dumbo adalah 20-30° C; kandungan oksigen terlarut dalam air 3 ppm; pH 6,5-8; kandungan CO₂ dibawah 15 ppm, NH₃ 0,05 ppm; dan NO₃ 250 ppm dan NO₂ sebesar 0,25 ppm (Khairuman, 2008).

2.1.4 Siklus Reproduksi

Apabila lele dumbo telah mencapai usia dewasa, lele jantan akan segera berpasangan dengan lele betina untuk mengadakan proses pemijahan. Lele betina akan meletakkan telurnya di atas dasar sarangnya. Bersamaan dengan itu, lele jantan akan menyemprotkan spermanya di sekitar telur-telur tersebut, sehingga telur dapat terbuahi. Telur-telur tersebut akan menetas dalam jangka waktu 2-3 hari (Najiyati, 2002). Ditambahkan oleh Djatmika (1986) dalam Rustidja (1997), ikan lele dapat kawin sepanjang waktu dengan syarat pemberian air yang cukup dan berkesinambungan. Ikan lele jantan akan melindungi telur atau burayak yang masih lemah.

Biasanya seekor lele jantan dapat mencari pasangan lain yang berbeda sehingga induk betina hanya dipijahkan dengan seekor induk jantan. Dibanding ikan mas atau nila, seekor induk betina dapat dilayani oleh beberapa ekor induk jantan (Prihartono *et al.*, 2000). Menurut Najiyati (2002), di alam bebas, biasanya lele akan memijah pada sore hari di musim hujan. Pemijahan secara buatan oleh para peternak lele dapat diatur sehingga perkawinan dapat berlangsung sepanjang tahun.

2.2 Ciri-ciri Induk Ikan Lele yang Telah Matang Gonad

2.2.1 Induk Jantan

Menurut Anonymous (2007) ciri-ciri ikan lele jantan yang telah matang gonad antara lain sebagai berikut :

- Proporsi kepala jantan lebih kecil dibanding ikan betina.
- Umur 8-24 bulan.
- Kelamin jantan menonjol dan membengkak terletak di belakang anus dan memanjang ke arah belakang dengan warna kemerahan.
- Gerakan induk jantan lebih lincah dibanding induk ikan betina.
- Muncul bintik-bintik kecil di sekitar sirip dorsal.
- Kulit induk jantan lebih halus dibanding induk betina.



Gambar 2. Urogenital papilla ikan lele jantan (Rizky, 2009).

2.3 Spermatozoa dan Proses Spermatogenesis

Proses pembentukan spermatozoa terjadi di dalam testes. Testes ikan berbentuk memanjang dalam rongga badan dibawah gelembung renang di atas usus. Jaringan pengikat yang disebut *mesentrium* menempelkan testes ini pada rongga badan di bagian depan gelembung renang (Rustidja, 2000).

Sel yang hidup dan bergerak di dalam semen disebut spermatozoa. Spermatozoa yang normal terdiri dari kepala dan ekor. Bagian ekor terbagi atas leher (tengah), bagian utama dan bagian ujung (Partodihardjo, 1992). Menurut Rachman (2003) spermatozoa adalah spermatocyte sekunder yang membelah menjadi spermatid yang mengadakan metamorphose menjadi gamet "motile" (dapat bergerak) dan mempunyai potensi fungsional.

Sperma adalah sel-sel spermatozoa yang berada dalam larutan seminal dan dihasilkan oleh hidrasi testes, atau salah satu bagian dari alat reproduksi ikan (Ari, 2008). Spermatozoa merupakan sel padat dan sangat khas, tidak tumbuh atau membagi diri serta tidak mempunyai peranan fisiologis apapun pada hewan yang menghasilkannya, semata-mata hanya untuk membuahi telur pada jenis yang sama (Soeparna, 1980 *dalam* Ari 2008).

Menurut Fujaya (2004) perkembangan gamet jantan dan spermatogonium menjadi spermatozoa melalui dua tahap, yakni spermatogenesis spermiogenesis. Spermatogenesis adalah tahap perkembangan spermatogonium menjadi spermatid disebut spermatogenesis, sedangkan spermiogenesis adalah metamorfosa spermatid menjadi spermatozoa. Awal spermatogenesis ditandai dengan berkembang biaknya spermatogonia beberapa kali melalui pembelahan mitosis, untuk memasuki spermatosit primer dibutuhkan beberapa kali pembelahan mitosis. Selanjutnya terjadi pembelahan meiosis, dimulai dengan kromosom berpasangan, yang diikuti dengan duplikasi membentuk tetraploid (4n). satu spermatosit primer tetraploid membentuk dua spermatosit sekunder yang diploid (2n). satu spermatosit sekunder diploid membelah diri menjadi dua spermatid haploid (n).

2.3.1 Pengambilan Sperma Ikan Lele

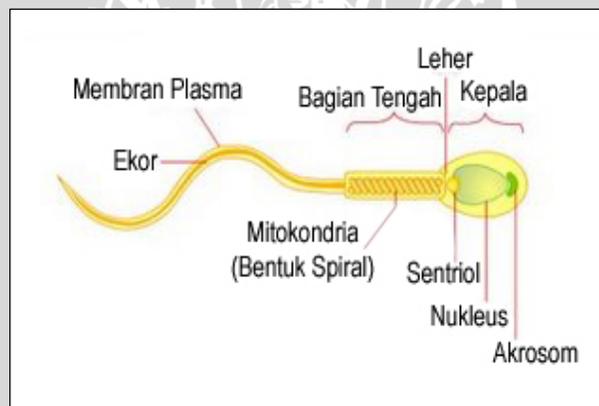
Induk ikan jantan dilakukan pembedahan pada bagian perut untuk diambil

Created with

gonad yang telah matang dan sudah berisi sperma (Jatilaksono, 2007). Menurut Anonymous (2010) Langkah-langkah pengambilan sperma ikan lele adalah dengan mengambil kantong sperma (gonad) dari induk jantan ikan lele dengan membedah bagian perutnya. Kemudian gunting kantong sperma (gonad) dan keluarkan cairan spermanya.

2.3.2 Stabilisasi Kondisi Sperma

Sperma yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama, karena kondisinya berubah. Oleh karena itu spermatozoa yang telah ditampung diusahakan mempunyai kondisi yang dapat mendukung kehidupannya. Salah satu cara yang digunakan adalah diberikannya bahan pengencer (NaCl fisiologis) (Rustidja, 1999).



Gambar 3. Bagian – bagian Sel Spermatozoa (Anonymous, 2008)

Pada dasarnya, sperma memiliki bagian-bagian yang masing-masing memiliki fungsi yang mendukung proses fertilisasi dapat berlangsung. Bagian-bagian tersebut terbagi atas 3 bagian utama, yaitu:

1. Bagian Kepala

Pada bagian kepala spermatozoon ini, terdapat inti tebal dengan sedikit sitoplasma yang diselubungi oleh selubung tebal dan terdapat 23 kromosom dari sel jantan. Selubung tebal yang dimaksud adalah akrosom, fungsi dari akrosom

adalah untuk melindungi, juga menghasilkan enzim. Akrosom ini mengandung enzim pembuahan yaitu hialuronidase dan akrosin. Yang masing-masing enzim tersebut memiliki fungsi yang berbeda. Hialuronidase merupakan enzim yang dapat melarutkan hialuronid pada korona radiata ovum, sehingga spermatozoon dapat menembus dan membuahi ovum. Sementara akrosin merupakan enzim protease yang dapat menghancurkan glikoprotein yang terdapat di zona pellusida ovum.

2. Bagian Badan

Terdapat sebuah mitokondria berbentuk spiral dan berukuran besar, berfungsi sebagai penyedia ATP (energi untuk pergerakan ekor). Mitokondria dinamakan “pusat energi” bagi sel, karena menyaring energi dari zat gizi dan oksigen serta selanjutnya menyediakan sebagian besar energi (95%) yang diperlukan agar sel dapat melakukan fungsinya. Mitokondria berperan dalam respirasi sel yang menghasilkan ATP (*Adenosine Triphosphate*) sebagai energi untuk metabolisme sel.

Respirasi yaitu suatu proses pembebasan energi yang tersimpan dalam zat sumber energi melalui proses kimia dengan menggunakan oksigen. Dari respirasi akan dihasilkan energi kimia ATP untuk kegiatan kehidupan, seperti sintesis (anabolisme), gerak, pertumbuhan. Oleh sebab itu energi kimia yang berupa ATP berfungsi untuk menggerakkan ekor pada sel spermatozoa.

3. Bagian Ekor

Pada bagian ekor sperma yang cukup panjang terdapat Axial Filament pada bagian dalam dan membran plasma dibagian luar yang berfungsi untuk pergerakan sperma berupa flagella untuk pergerakan spermatozoon. Bagian ini mengandung sedikit sekali sitoplasma dan mengandung rangka poros yang disebut aksonema (Anonymous, 2008).

Salisbury dan Vandemark (1985), mengatakan bahwa bahan pengencer yang baik harus memenuhi kriteria sebagai berikut, 1). Memberikan unsur mineral yang dibutuhkan untuk kehidupan spermatozoa; 2). Menyediakan bahan makanan sel spermatozoa untuk proses metabolisme *aerob* dan *anaerob*; 3). Memiliki lipoprotein atau lecithin untuk melindungi spermatozoa dari kejutan suhu dingin (*cold shock*); 4). Menyediakan penyangga terhadap produk akhir metabolisme yang bersifat racun terhadap spermatozoa; 5). Bebas dari substansi produk kuman-kuman atau organisme penyakit menular yang berbahaya terhadap spermatozoa.

2.3.3 Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa

a. Pergerakan Sperma

Aktifitas spermatozoa dimulai ketika sperma bersentuhan dengan air, dengan demikian motilitas spermatozoa yang tinggi sangat berpengaruh terhadap terjadinya fertilisasi (Woynarovich dan Horvart, 1980 dalam Rustidja, 2000). Menurut Fujaya (2004) spermatozoa bersifat immotil dalam cairan plasmanya, dan akan bergerak apabila bercampur dengan air. Gerak progresif secara berkesinambungan hanya terjadi satu menit setelah bersentuhan dengan air dan hanya 50% yang masih dapat berenang setelah 3 menit. Sebagian besar spermatozoa ikan air tawar dapat motil tidak lebih dari 2-3 menit setelah bersentuhan dengan air. Menurut Stoss dan Donaldson (1982) dalam Rustidja (2000) di dalam testes dan dalam seminal plasma, spermatozoa dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan selama musim pemijahan. Untuk ikan air tawar aktifasi spermatozoa terjadi jika perairan di sekitarnya bersifat hipotonik.

Motilitas merupakan nilai pergerakan dan juga merupakan salah satu tolak ukur keadaan spermatozoa jantan (Sujana, 2007). Hermawanto dan Hadiwidjaja (2008) menjelaskan bahwa biasanya empat sampai enam lapangan pandang

yang diperiksa untuk memperoleh pergerakan sperma secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan persentase setiap kategori motilitas. Dianjurkan untuk melakukan pemeriksaan ulang dengan tetesan sperma kedua yang diperlakukan dengan tatacara sama. Kategori yang dipakai untuk mengklasifikasi motilitas sperma disebut dalam katagori sebagai berikut :

- (a) jika sperma bergerak cepat dan lurus ke depan, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *fast progressive*.
- (b) jika geraknya lambat atau sulit maju lurus atau bergerak tidak lurus, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *slow progressive*.
- (c) jika tidak bergerak maju, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *non progressive*.
- (d) Jika sperma tidak bergerak, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *immotile*.

b. Kemampuan Hidup Sperma

Menurut Rachman (2003) jangka waktu hidup spermatozoa bergantung pada spesies dan substrat tempat mereka diletakkan. Jika sperma diletakkan pada air maka jangka waktunya lebih pendek daripada terletak pada tubuh hewan betina. Kemungkinan hidup sel sperma dipengaruhi juga oleh suhu secara umum hidup lebih lama pada suhu yang rendah dari pada suhu yang tinggi.

Permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Apabila spermatozoa tersebut mati maka permeabilitas membrannya meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dengan spermatozoa yang mati (Tang dan Affandi, 2001 dalam Yulham, 2007).

Kemampuan hidup spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu Penurunan suhu dari suhu kamar ke suhu dingin perlu dilakukan secara bertahap untuk

menghindari terjadinya *cold shock* (Toelihere, 1981). Untuk memastikan apakah sperma yang tidak motil tersebut hidup atau mati, perlu dilakukan uji viabilitas sperma. Partodiharjo (1992) menyatakan bahwa setelah sperma mati, sedikitnya 100-2.000 sel atau yang terbaik 500 sel dihitung untuk menentukan prosentase spermatozoa yang hidup.

2.4 Pengaruh Kejut Listrik Pada Sel Sperma

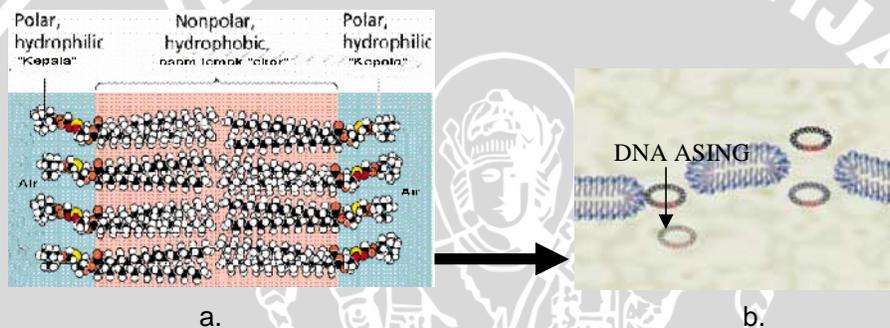
Jenis kejut yang dapat digunakan antara lain kejut suhu, kejut tekanan, kejut dengan menggunakan bahan kimia dan kejut listrik (Carman, 1990). Menurut Evariny (2005) kejut listrik dengan tegangan yang tinggi akan berpengaruh terhadap produksi spermatozoa, sperma yang dikeluarkan dari testis bisa menjadi cacat dan dapat menurunkan tingkat motilitas spermatozoa serta dapat meningkatkan nilai mortalitas dan abnormalitas pada spermatozoa.

Arus listrik adalah muatan listrik yang bergerak di dalam sambungan atau dalam komponen. Sedangkan tegangan listrik adalah perbedaan potensi listrik antara dua titik dalam rangkaian listrik, dinyatakan dalam satuan volt. Besaran ini mengukur energi potensial sebuah medan listrik yang menyebabkan aliran listrik dalam sebuah konduktor listrik. Tergantung pada perbedaan potensi listrik suatu tegangan listrik dapat dikatakan ekstra rendah, rendah, tinggi atau ekstra tinggi (Taghyr, 2008).

Ketika sel diberi kejut listrik, molekul yang menyusun membran sel akan saling bertentangan dan suatu potensi tegangan dialirkan kedalam sel (gambar 4). Ketika beda-potensial melebihi suatu keseimbangan antara di dalam dan bagian luar selaput sel, maka area selaput yang dilokalisir untuk sementara membuka dan di dalam akan terbentuk pori-pori, kemudian membiarkan difusi DNA asing ke dalam sel (Knight 1981; Tsong 1983; Serpersu, Kinoshita dan Tsong, 1985; Sowers dan Lieber 1986; Knight and Scrutton 1986 dalam Sin,

2001). Proses tersebut mungkin menimbulkan kerusakan pada membran atau selaput sperma karena Jeyendran (1986) menyatakan, bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa karena seperti diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting peranannya dalam metabolisme sel.

Dengan mengurangi kecepatan rusaknya permeabilitas membran spermatozoa, maka kebutuhan akan nutrisi tidak terhambat dan selanjutnya sel spermatozoa tersebut dapat bertahan lama (Hidayahturrahmah, 2007).



Gambar 4. (A) menunjukkan susunan dari lapisan dinding sperma yaitu phospholipid bilayer yang terdiri oleh hydrophobic dan hydrophilic. (B) setelah lapisan diberi kejutan maka akan terbentuk rongga sehingga DNA asing dapat masuk (www.maxcyte.com dan www.emc.maricopa.edu).

Menurut Weaver (1995), apabila tegangan yang diberikan terhadap sperma terlalu berlebihan maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah, oleh sebab itu maka perlu diketahui tegangan yang sesuai sehingga tidak sampai terjadi kerusakan pada sel sperma.

2.5 Hubungan Motilitas dan Viabilitas Sperma

Kerusakan dapat terjadi pada sperma akibat gangguan proses spermatogenesis antara lain, pertama kerusakan mitokondria sehingga motilitas

spermatozoa terganggu serta gangguan siklus spermatogenesis sehingga konsentrasi spermatozoa juga menurun. Dan untuk memastikan apakah spermatozoa yang tidak motil tersebut hidup atau mati, maka perlu dilakukan uji viabilitas spermatozoa. Sperma yang immotile/ motilitas $< 5\%$, dianjurkan untuk dilakukan pemeriksaan *viability assay* (Ningrum, 2006). Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa akan berbanding terbalik yaitu semakin meningkatnya waktu motilitas spermatozoa maka akan semakin menurun waktu viabilitasnya (Hidayaturrahmah, 2007).

2.6 Metode Elektroporasi

Elektroporasi adalah proses penerapan medan listrik untuk sel hidup dalam jangka waktu yang singkat. Elektroporasi memungkinkan pembentukan pori - pori pada molekul eksogen seperti DNA sehingga memungkinkan untuk masuk ke dalam sel. Elektroporasi merupakan teknik yang sangat efisien untuk memasukkan asam nukleat, protein, karbohidrat, RNA, pewarna, partikel virus dan molekul lain dalam berbagai macam sel seperti prokariotik dan eukariotik (Anonymous, 2006).



Gambar 5. Gene Pulser BIO-RAD

Metode elektroporasi yang umum digunakan untuk menghasilkan kondisi yang optimal terbukti memakan waktu. Dengan diperkenalkannya “*Gene Pulser* sistem elektroporasi” (seperti gambar 5) kondisi optimal dapat ditentukan dengan cepat. *Gene Pulser* adalah sistem elektroporasi modular, yang mencakup unit utama, memiliki dua modul aksesori (modul CE dan modul PC). Modul CE digunakan untuk elektroporasi sel eukariotik, termasuk sel mamalia dan protoplas tanaman. Sedangkan modul PC digunakan untuk elektroporasi sel prokariotik seperti bakteri dan jamur, dimana pulsa tegangan tinggi diterapkan pada sampel volume kecil dan ketahanan yang tinggi. Sistem yang menghasilkan bentuk gelombang *eksponensial* dan persegi (*square*), memungkinkan untuk memilih gelombang yang terbaik untuk proses elektroporasi, baik secara *eksponensial* maupun *square* telah digunakan dengan sangat efektif. Bentuk gelombang elektroporasi dapat memiliki dampak yang signifikan terhadap efisiensi transformasi pada tipe sel yang berbeda (Anonymous, 2006).

Kondisi voltase dari metode *square wave* yaitu dinaikkan sampai pada amplitudo yang diinginkan kemudian dijaga tetap konstan sampai pada waktu yang telah ditentukan kemudian kembali ke nol. Sedangkan pada metode *exponential wave*, voltase dinaikkan sampai pada amplitudo yang diinginkan kemudian menurun secara eksponensial (Sin, 2001).

Pada metode *square wave* idealnya memiliki besar yang sama antara awal dan diakhir pemberian tegangan, meskipun menggunakan pembebanan kapasitor untuk menghasilkan bentuk gelombang tersebut, hasilnya tegangan diakhir (V_t) proses akan selalu lebih rendah daripada tegangan diawal (V_o). Hal ini dikarenakan saat kapasitor ditahan dan sudah pada batas yang ditetapkan, kemudian secara sekejap arus *maksimum* mengalir melewati sirkuit dan menurun secara drastis sampai nol (0) (Anonymous, 2006).

Untuk menghasilkan kejutan *square wave*, maka tegangan harus diakhiri pada suatu waktu tertentu (t) mengikuti pelepasan dari kapasitor. Yang dimaksud waktu (t) adalah lama tegangan (*pulse length*). Apabila waktu kejutan semakin lama maka perbedaan antara tegangan awal (V_t) dan tegangan akhir (V_o) akan semakin besar (Anonymous, 2006).

Penurunan tegangan dapat terjadi pada metode *square wave* atau sebaliknya, hal ini berkaitan antara ketahanan (*capacitance*) dari alat dan hambatan (*resistance*) dari sampel. Kecilnya penurunan tegangan pada akhir kejutan merupakan fungsi dari tegangan awal (V_o) dan dinamakan *droop* dan hal ini ditunjukkan dengan persamaan :

$$Droop = \frac{(V_o - V_t)}{V_o}$$

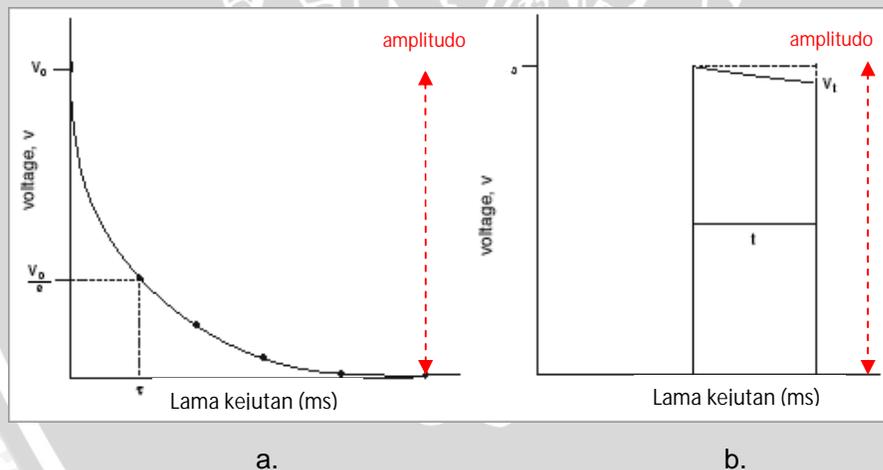
Untuk menyesuaikan tegangan agar mendekati metode *square wave* yang tepat, maka nilai *droop* harus dikurangi (i.e. $V_t = V_o$ dan $V_o - V_t = 0$). Berdasarkan beberapa penelitian, hal ini terjadi dengan memilih kisaran tertinggi untuk R (*resistance*) dan C (*capacitance*) (Anonymous, 2006).

Dari beberapa contoh yang diberikan, nilai R diharapkan tetap. *Gene Pulser Xcell* menggunakan kapasitor 50 μF untuk tegangan tinggi sedangkan untuk tegangan rendah 3247 μF . Untuk masing-masing tegangan nilai C juga bisa dalam kondisi tetap. Oleh karena itu pada contoh yang sama, apabila *pulse length* dinaikkan, *droop* juga akan meningkat (Anonymous, 2006).

Peningkatkan *resistance* (R) sampel akan menurunkan *droop*, dengan lama pemberian tegangan (*pulse length*) berapapun. Meningkatkan *resistance* sampel dapat dengan cara a) mengurangi temperatur sampel, b) mengurangi kadar ion pada pengencer, c) mengurangi volume cairan dalam *cuvette* pada kasus media dengan *resistance* rendah (Anonymous, 2006).

Parameter elektrik yang paling penting dalam percobaan elektroporasi adalah kekuatan bidang ($E = V/cm$, voltase antara elektroda yang dibagi dengan jarak antar elektroda) dan lama kejutan. Lama kejutan adalah tergantung dari hambatan (*resistance, ohm*) dan ketahanan (*capacitance, farad*) pada sirkuit. Ketahanan ditentukan dari kekuatan ion dari sampel dan jarak antar elektroda. Kekuatan ion bersifat berbanding terbalik dengan hambatan sehingga semakin tinggi kekuatan ion dari media maka hambatannya akan semakin kecil. Apabila jarak antar elektroda semakin jauh maka hambatan yang dihasilkan akan semakin besar. Ketahanan yang terjadi tergantung dari kapasitor pada sirkuit. Jika pada kondisi hambatan rendah dan ketahanan tidak ditentukan maka dihasilkan kejutan yang pendek (Shigekawa dan Dower, 1988 dalam Sin, 2001).

Hubungan kedua parameter (Voltage dan lama kejutan) dapat dilihat pada gambar 6 di bawah ini :



Gambar 6 a. Eksponensial; b. Square Wave

Pada metode *Eksponensial* (gambar 6.a) tegangan yang dilepaskan dari kapasitor yang dipilih meluruh dengan cepat dari waktu ke waktu. Kejutan yang diberikan dicirikan oleh kekuatan bidang (kV/cm) dan lama kejutan yang konstan (ms). Penyesuaian tegangan pada *Gene Pulser* untuk jarak elektroda dikenal dengan kontrol kekuatan bidang. Kekuatan medan, hambatan dan nilai-nilai

kapasitansi ditetapkan oleh waktu yang konstan dan tegangan yang diberikan. Pada metode ini, ketika sebuah kapasitor dibebankan ke tegangan V_0 dan kemudian dikejutkan ke dalam sel, maka tegangan yang diberikan untuk sel akan semakin berkurang seiring bertambahnya waktu yang terlihat pada kurva *eksponensial*, sehingga tegangan (V) pada setiap waktu (t) yang diberikan $V_0 V = e^{-t/RC}$, dimana $R = Resistance$, $C = Capacitance$, dan $t = CR$, maka $V = V_0 / e$. nilai CR sebagai waktu yang konstan dari tegangan *eksponensial*. Tegangan ini ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen. Pada metode ini panjang kejutan memiliki nilai yang sama dengan lama kejutan. Adanya penurunan tegangan oleh peluruhan *eksponensial* pada akhir kejutan, kejadian ini disebut kejutan layu dan diukur sebagai persentase dari tegangan awal. Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Eksponensial* adalah tegangan, waktu dan kekuatan bidang.

Sedangkan tegangan dari *Square wave* (**gambar 6.b**) lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan yang mana untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol. Amplitudo adalah jarak terjauh simpangan dari titik keseimbangan, akan tetapi dalam gelombang ini amplitude tergantung pada tegangan yang diberikan (**gambar 6**). Pada metode ini dicirikan oleh tegangan yang diberikan, panjang kejutan, jumlah kejutan dan panjang jarak diantara kejutan. Gelombang *square wave* dapat meningkatkan efisiensi dan kelangsungan hidup sel, karena panas yang dihasilkan oleh gelombang Square Wave relatif kecil sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan sel. Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Square wave* adalah tegangan, panjang kejutan, jumlah kejutan, dan panjang interval diantara kejutan (Anonymous, 2006).

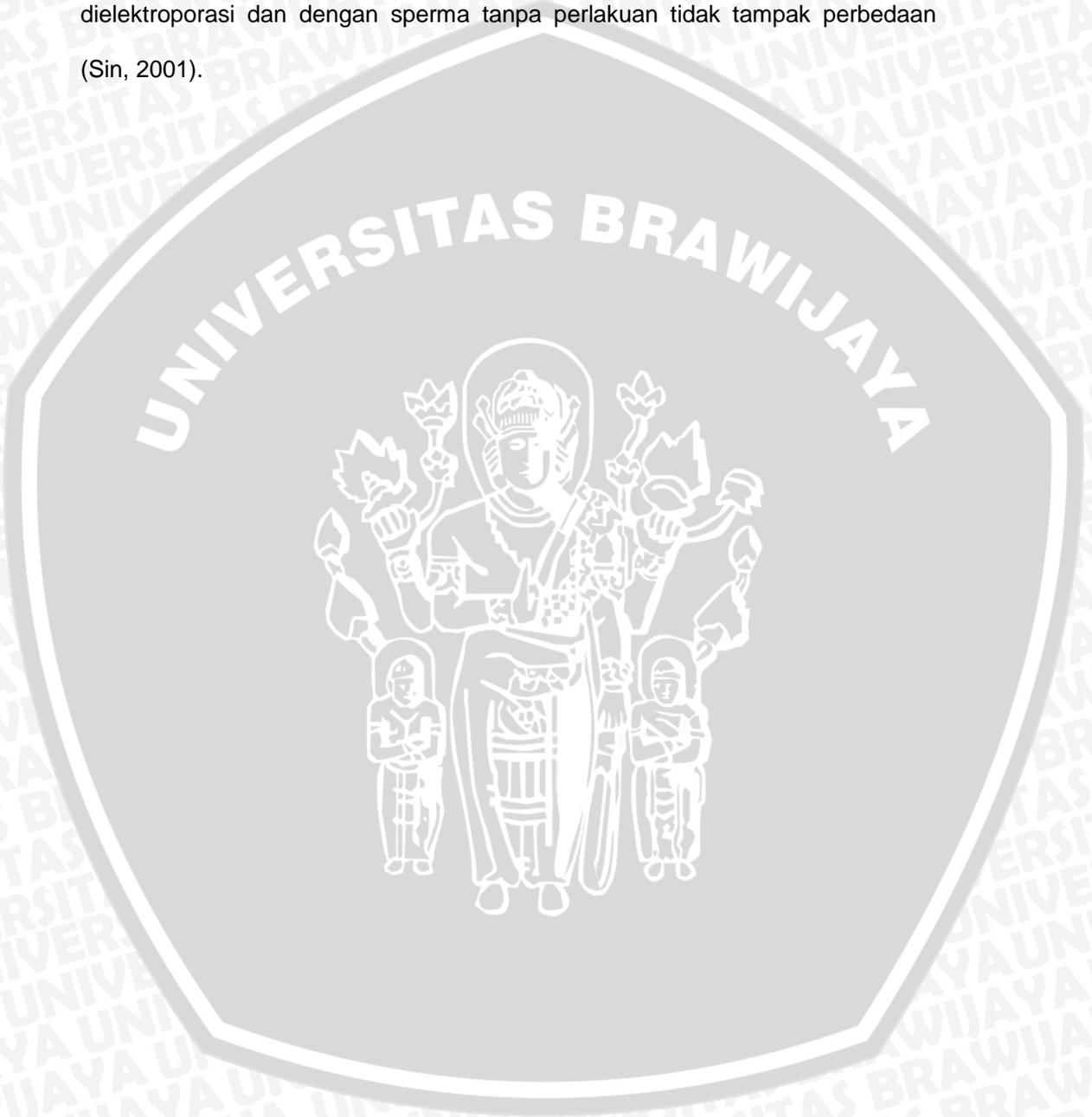
Pada metode *square wave* idealnya memiliki besar yang sama antara awal dan diakhir pemberian tegangan, meskipun menggunakan pembebanan kapasitor untuk menghasilkan bentuk gelombang tersebut, hasilnya tegangan diakhir (V_t) proses akan selalu lebih rendah daripada tegangan diawal (V_o). Hal ini dikarenakan saat kapasitor ditahan dan sudah pada batas yang ditetapkan, kemudian secara sekejap arus *maksimum* mengalir melewati sirkuit dan menurun secara drastis sampai nol (0). Untuk menghasilkan kejutan *square wave*, maka tegangan harus diakhiri pada suatu waktu tertentu (t) mengikuti pelepasan dari kapasitor. Yang dimaksud waktu (t) adalah lama tegangan (*pulse length*). Apabila waktu kejutan semakin lama maka perbedaan antara tegangan awal (V_o) dan tegangan akhir (V_t) akan semakin besar (Anonymous, 2006).

2.7 Elektroporasi Sperma

Sperma sebagai media transfer gen sangat potensi dikembangkan dalam transgenik ikan karena prosedurnya yang relatif alami dan lebih efisien (Samarsik, 2003). Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen pada ikan mas (*Cyprinus carpio*), lele Afrika (*Clarias gariepinus*) dan nila (*Oreochromis niloticus*) (Muller *et al.*, 1992) ikan salmon (*Salmo salar*) (Symond *et al.*, 1994a) dan ikan loach (Tsai *et al.*, 1994).

Sperma dapat menjadi vektor yang efisien dalam transfer gen. Efektifitas transfer gen dengan elektroporasi sperma sangat dipengaruhi kondisi listrik dan parameter biologi (Anderson dan Evans, 1988). Menurut Symonds *et al.* (1994a) bahwa pengambilan DNA oleh sperma yang akan ditransfer tergantung pada tegangan listrik (kV/cm atau V/cm) jumlah kejutan yang dikenakan dan konsentrasi DNA. Sedangkan efisiensi transfer DNA ke embrio dengan sperma yang dielektroporasi sangat dipengaruhi oleh tegangan dan lama kejutan.

Motilitas sperma ikan merupakan parameter kelangsungan hidup sperma, yang akan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan dan lama kejutan. Namun kelulushidupan dari embrio yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma tanpa perlakuan tidak tampak perbedaan (Sin, 2001).



III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan-bahan (lampiran 5) yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah antara lain :

1. Induk jantan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang akan dibedah untuk diambil gonadnya.
2. Gonad ikan lele jantan yang akan diambil cairan spermanya.
3. Sperma ikan lele dumbo yang akan diamati motilitas (pergerakan spermatozoa) dan viabilitasnya (daya hidup).
4. Larutan Na Fis yang digunakan untuk memudahkan dalam mengambil sperma ikan lele dumbo yang sudah di elektroporasi.
5. Eosin-negrosin untuk pewarnaan sperma yang akan diamati viabilitasnya dalam mikroskop.
6. Aquadest yang digunakan untuk mengaktifkan sperma.
7. Etanol 70% yang digunakan untuk merendam cuvet
8. Batu es yang digunakan untuk mendinginkan cuvet sebelum digunakan untuk proses elektroporasi sperma.

3.1.2 Alat

Sedangkan alat-alat (lampiran 4) yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah antara lain :

1. Satu set alat elektroporator (BIO-RAD) yang digunakan untuk memberi kejutan listrik pada sperma ikan lele dumbo.
2. Cuvet sebagai tempat sperma yang akan diberi kejutan listrik.
3. Mikroskop yang digunakan untuk mengamati viabilitas dan motilitas sperma

Created with



nitro PDF

professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

4. Kolam pemeliharaan induk ikan lele yang digunakan untuk media hidup induk ikan lele dumbo (di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya).
5. Bak plastik yang akan digunakan untuk memindah induk dari kolam ke dalam laboratorium dan kemudian akan disuntik.
6. Obyek glass yang digunakan untuk melihat motilitas masal sperma yang akan diamati pergerakannya di bawah mikroskop.
7. Cover glass yang digunakan untuk melihat motilitas individu sperma yang akan diamati pergerakannya di bawah mikroskop.
8. *Haemocytometer* yang digunakan untuk menghitung jumlah sel sperma.
9. Pipet volume untuk mengetahui jumlah volume sperma yang dihasilkan.
10. Pipet tetes yang akan digunakan untuk mengambil telur yang akan diamati perkembangannya di bawah mikroskop.
11. Mikro pipet yang digunakan untuk mengambil sperma yang ada di mangkok dan mengambil Na Fisiologis.
12. *Yellow tip* dan *white tip* yang akan dipasangkan ke mikro pipet untuk mengambil cairan sperma dan Na Fisiologis.
13. Tissue yang digunakan untuk membersihkan alat-alat.
14. Timbangan Digital yang digunakan untuk menimbang berat induk dan gonad ikan lele dumbo
15. Penggaris yang digunakan untuk mengukur panjang ikan lele dumbo.
16. Alat Sectio yang digunakan untuk membedah induk jantan yang akan diambil gonadnya.
17. Spuit yang digunakan untuk menyuntik induk ikan lele.
18. *Handtally counter* yang digunakan untuk menghitung jumlah sel sperma.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, dimana metode eksperimen adalah suatu metode yang dilakukan dengan mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variable-variabel yang diselidiki (Sahri, 1992). Menurut Sugiyono (2008) metode eksperimen adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain.

Tujuan dari penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol sebagai perbandingan (Nazir, 2003).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium, rumah kaca, dan peternakan. Karena media homogen maka media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model untuk RAL adalah sebagai berikut (Sastrosupadi, 2000) :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} : Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum

T_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ij : Pengaruh gallet percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

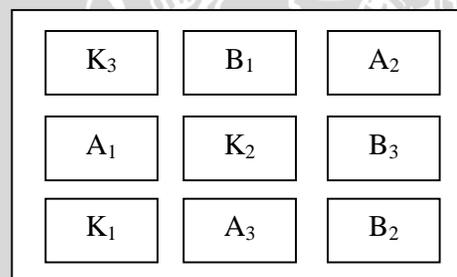
Penelitian ini menggunakan dua perlakuan yang masing-masing perlakuannya diulang sebanyak tiga kali dan kontrol diberikan pada semua perlakuan yang fungsinya untuk membandingkan dengan perlakuan. Dalam penelitian ini, perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut :

Perlakuan A = pemberian kejutan listrik dengan metode *Square Wave* menggunakan parameter ukur tegangan 40 v

Perlakuan B = pemberian kejutan listrik dengan metode *Eksponensial Wave* menggunakan parameter ukur tegangan 40 v

Perlakuan Kontrol (K) = tanpa pemberian kejutan listrik

Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian seperti pada Gambar 7 berikut ini:



Gambar 7. Denah percobaan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

Langkah pertama mempersiapkan alat elektroporasi sebagai alat kejutan listrik dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- Sambungkan steker alat ke sumber listrik yang sesuai.
- Tekan tombol "POWER" di samping kanan alat untuk menyalakan alat.
- Muncul tampilan awal yaitu "HOME SCREEN"

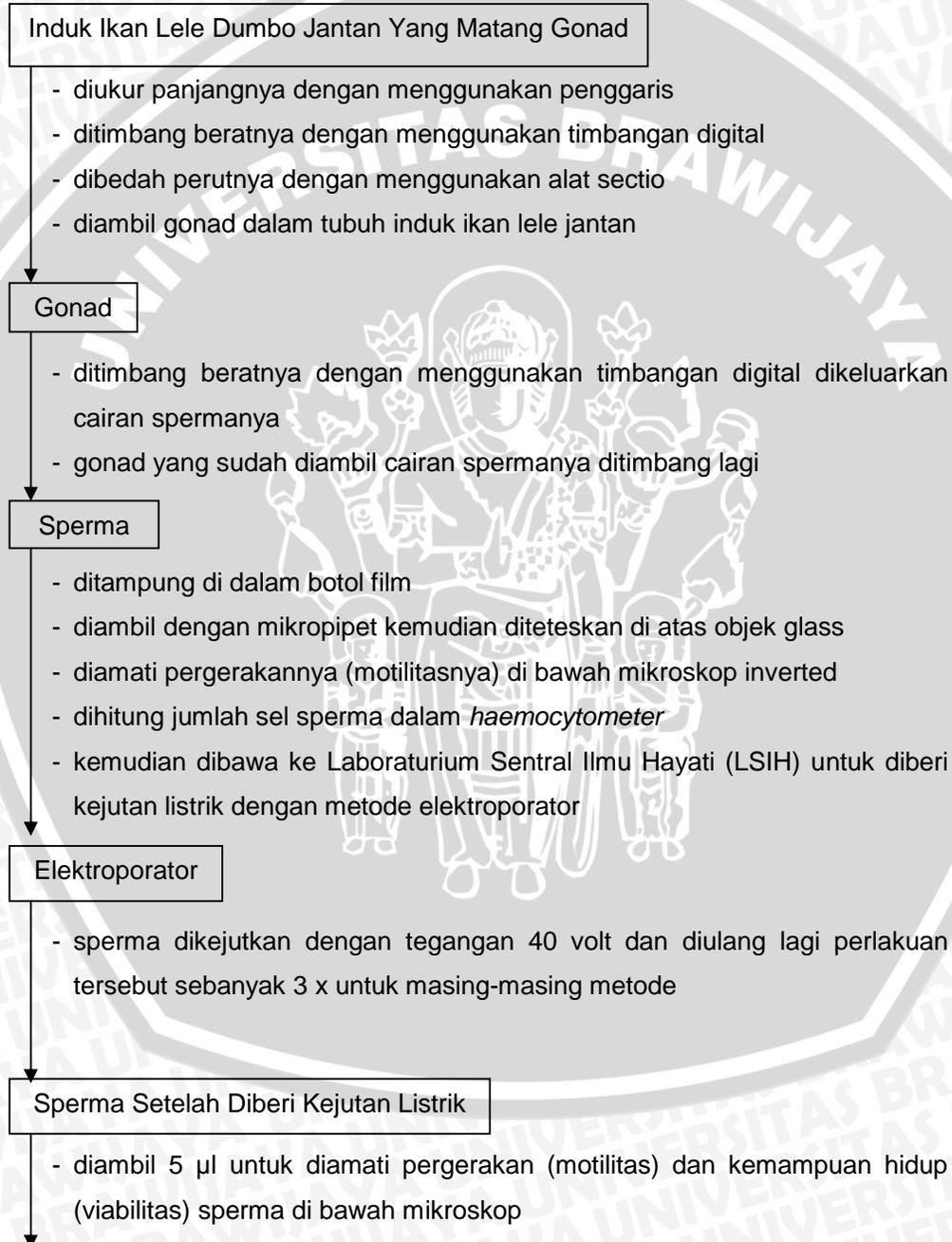
- Pada tampilan "*HOME SCREEN*" dipilih no 3 atau menggunakan panah keatas atau kebawah untuk memilih "*Square wave protocol / Eksponensial protocol*".
- Kemudian muncul tampilan detail metode *Square wave / Eksponensial protocol*, selanjutnya masukkan parameter yang akan ditentukan seperti:
 - Besar tegangan 40 volt
- Siapkan *cuvette* dan yang akan dipakai yaitu *cuvette* ukuran 0,2 cm
- Setelah parameter yang dimasukkan sesuai maka simpan dan berikan tanda dengan abjad, agar saat memberikan *pulse* dapat dilakukan dengan cepat.
- Persiapkan sampel dengan langkah sebagai berikut:
 1. Masukkan 25 μ l sperma ke dalam *cuvette* menggunakan mikropipet setelah itu tutup *cuvette* dengan rapat.
 2. Buka tutup "*shock pod*"
 3. Pasang *cuvette* berisi sampel pada "*shock pod*"
 4. Tutup kembali "*shock pod*"
 5. Setelah itu sperma siap untuk diberi kejutan
- Setelah itu pilih besar tegangan yang akan diberikan dengan memilih tanda, kemudian tekan "enter" sehingga tampilan tegangan akan terbuka.
- Tekan tombol "*PULSE*" untuk memulai memberikan kejutan pada sampel.
- Setelah itu akan muncul tampilan yaitu hasil perlakuan yang diberikan pada sampel.
- Dicatat hasil yang muncul di layar alat elektroporator.

Setelah sperma diberi kejutan listrik kemudian 25 μ l sperma yang ada di dalam *cuvette* ditambahkan larutan Na Fisiologis sebanyak 275 μ l, fungsi penambahan larutan Na Fisiologis ini sendiri adalah agar memudahkan dalam

mengambil sperma yang ada di dalam *cuvette* serta untuk menjaga kondisi sperma tetap stabil.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

Skema kerja dari kegiatan penelitian



- dicatat dan dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan (sebelum dan sesudah) kejutan
- dicatat serta dibandingkan viabilitas dan motilitas sperma hasil elektroporasi dengan metode Eksponensial/Square wave
- dari data yang diperoleh di atas dapat diketahui perbedaan antara kedua metode tersebut

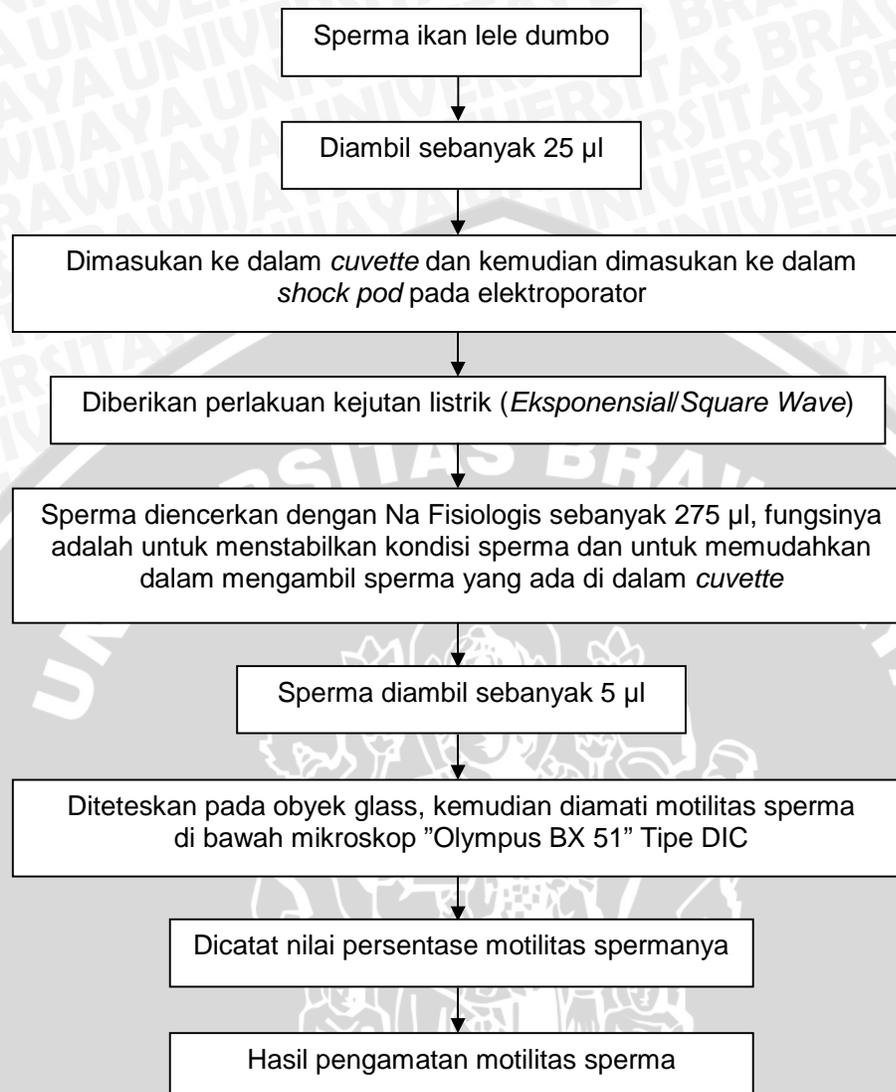
Hasil Penelitian

3.5 Parameter Uji Penelitian

3.5.1 Motilitas Spermatozoa

Motilitas sperma sangat bergantung terhadap lingkungan dan proses preserfasi, pembekuan yang cepat dapat melindungi sperma dari kerusakan akibat efek larutan tetapi dapat mengakibatkan *cool shock* dan pembentukan kristal s yang akan merusak sperma, pembekuan yang lambat akan mencegah munculnya kristal s tetapi akan menyebabkan naiknya konsentrasi garam dan tekanan osmotik yang akan merusak protein yang dikandung oleh sel (Wira, 2007). Dan menurut Antogozo (2008) Pergerakan sperma dipengaruhi oleh salinitas air. Umumnya pergerakan sperma ikan yang memijah dalam air laut lebih lama daripada air tawar, hal ini disebabkan karena air laut lebih banyak mengandung zat-zat yang terdapat dalam sperma.

Setelah sperma dikeluarkan dari gonad ikan lele dumbo, kemudian sperma diberi perlakuan tegangan dengan metode yang berbeda, yaitu *Eksponensial* dan *Square Wave*. Setelah itu dilakukan pengamatan motilitas untuk mengetahui prosentase nilai motilitasnya. Untuk lebih jelasnya prosedur pengamatan motilitas sperma dapat dilihat pada skema kerja berikut ini:



Lama penyimpanan sperma berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa pasca pembekuan, fertilitas dan daya tetas telur ikan. Semakin lama sperma disimpan akan terjadi penurunan terhadap motilitas, fertilitas dan daya tetas telurnya (Rustidja 2000). Menurut Paisal (2008) motilitas sperma bisa dikatakan normal apabila 40% atau lebih sperma dapat bergerak dan dapat membuahi telur. Tetapi beberapa pusat laboratorium mengatakan bahwa nilai normal untuk motilitas sperma adalah 60% atau lebih, baru sperma dapat dikatakan normal dan mampu untuk membuahi telur.

3.5.1.1 Cara Penghitungan Persentase Motilitas Sperma

Penghitungan persentase motilitas sperma dilakukan dengan melihat pergerakan sperma di bawah mikroskop dalam satu bidang pandang. Dari pergerakan sel spermatozoa tersebut dapat dilihat pergerakannya sebagai dasar perkiraan penghitungan persentase motilitas sperma. Pengamatan pergerakan sperma ini dilakukan oleh lebih dari 3 orang untuk mendapatkan nilai yang valid.

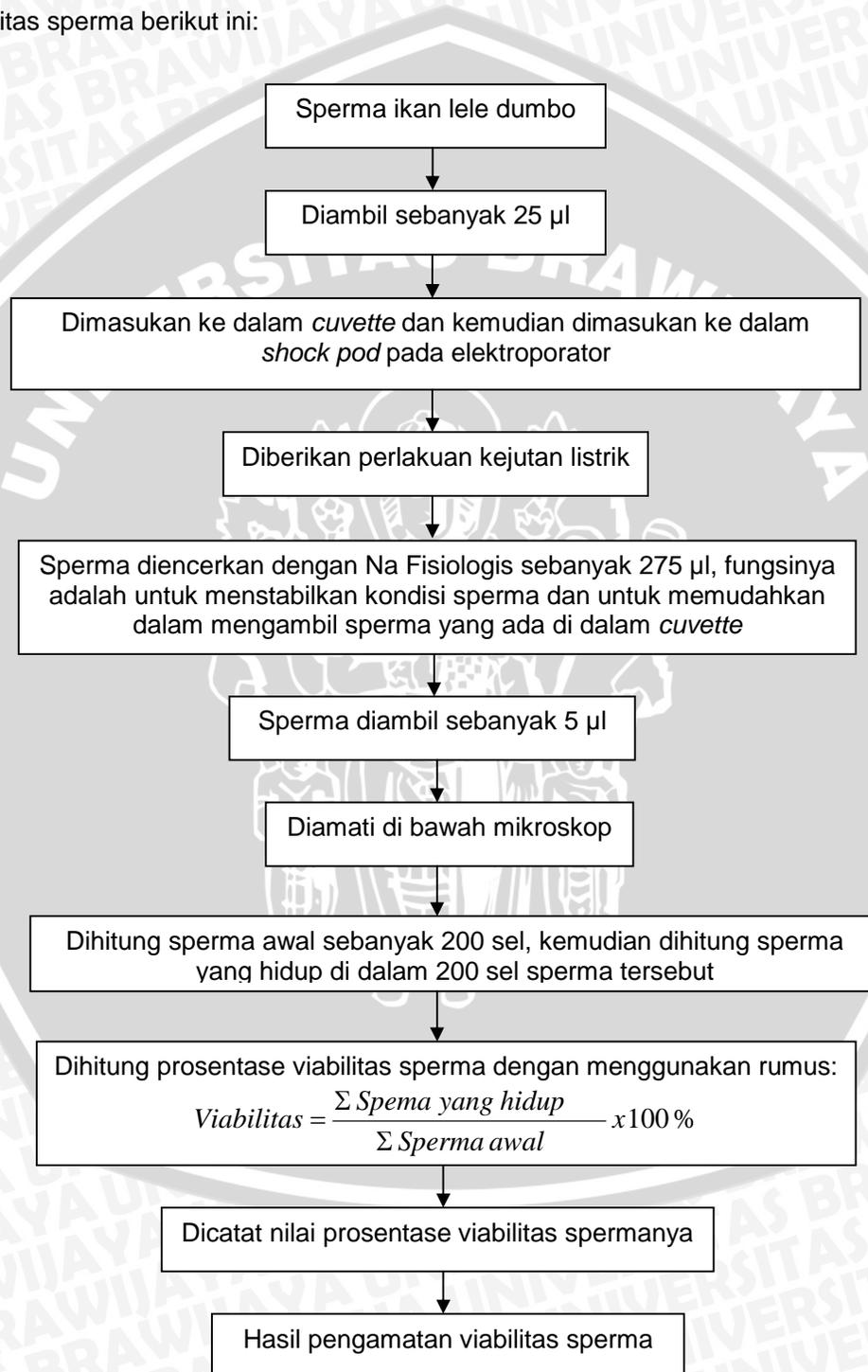
Kategori yang dipakai untuk mengklasifikasi motilitas sperma disebut dalam kategori sebagai berikut :

- (a) jika sperma bergerak cepat dan lurus ke depan, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *fast progressive*.
- (b) jika gerakannya lambat atau sulit maju lurus atau bergerak tidak lurus, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *slow progressive*.
- (c) jika tidak bergerak maju, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *non progressive*.
- (d) Jika sperma tidak bergerak, maka motilitas spermatozoa ini masuk ke dalam katagori *immotile*.

3.5.2 Viabilitas Spermatozoa

Kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah (Toelihere, 1981 dalam Rustidja, 2000). Pembekuan dan pencairan sperma kembali menyebabkan terjadinya perubahan intrastruktural pada membran plasma, hilangnya beberapa matrik mitokondria dan penurunan densitas elektron dari matrik mitokondria menyebabkan hilangnya viabilitas spermatozoa (Jones dan Stewart, 1979 dalam Rustidja, 2000).

Setelah sperma diberi perlakuan elektroporasi kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dan dihitung persentase viabilitasnya. Untuk metode perhitungan prosentase viabilitas sperma dapat dilihat pada skema kerja viabilitas sperma berikut ini:

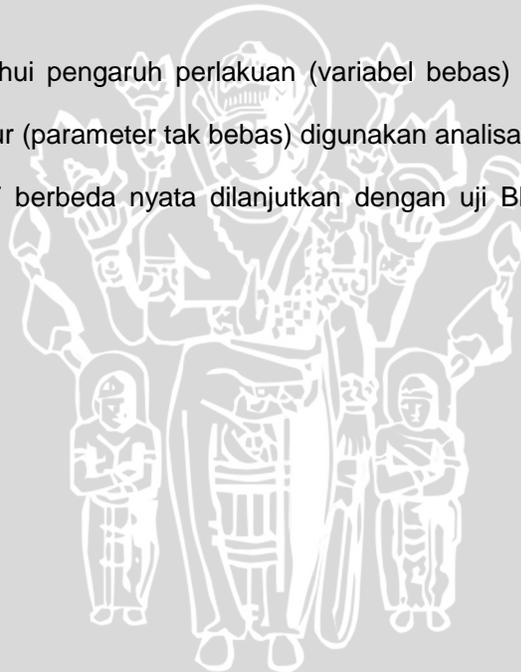


3.5.2.1 Cara Penghitungan Persentase Viabilitas Sperma

Penghitungan persentase viabilitas sperma dilakukan dengan menghitung jumlah sperma yang hidup kemudian dibagi dengan jumlah sperma awal dan dikali 100 %. Pada saat pengamatan viabilitas, sperma awal dihitung sebanyak 200 sel sperma, kemudian dihitung sperma yang terwarnai dan tidak terwarnai dalam 200 sel tersebut untuk mendapatkan prosentase sperma yang hidup Partodiharjo (1992) menyatakan bahwa sedikitnya 100-2.000 sel sperma dihitung untuk menentukan prosentase sperma yang hidup

3.6 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur (parameter tak bebas) digunakan analisa keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda nyata dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil).



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Sperma Kontrol

Sperma yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kualitas yang cukup baik jika dilihat dari motilitas dan viabilitas spermnya. Kepadatan sel sperma dalam 1 ml diperoleh sebesar $\pm 4,3 \times 10^9$ sel/ ml. Menurut Dacie *et al.* (1984) konsentrasi sperma berkisar antara $\pm 3,7 - 11,9 \times 10^9$ sel/ ml, karena ikan lele mampu menghasilkan telur sampai ratusan ribu butir. Kualitas sperma dapat dilihat dari dua parameter yaitu motilitas dan viabilitas.

Selama penelitian diperoleh prosentase motilitas sperma kontrol sebelum dilakukan perlakuan sebesar 60% dan viabilitas sebesar 79,9%. Selama penelitian induk jantan yang digunakan sebanyak 5 ekor Induk jantan diukur panjang total setelah itu ditimbang berat tubuhnya kemudian induk disuntik menggunakan ovaprim. Setelah itu induk jantan di bedah untuk diambil gonadnya dan dikeluarkan cairan spermnya, sehingga dapat diketahui rata-rata panjang tubuh, berat tubuh dan berat gonad sebagaimana terlihat pada tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Data Induk Jantan yang digunakan dalam penelitian

Nomor Ikan	Berat Tubuh	Panjang Tubuh	Berat Gonad	Volume Sperma
Ikan 1	0,91 Kg	53 cm	5,82 gram	1 ml
Ikan 2	1,6 Kg	65,5 cm	10,3 gram	1,7 ml
Ikan 3	1,12 Kg	58 cm	7,8 gram	1,1 ml
Ikan 4	1 Kg	61 cm	8,3 gram	1,4 ml
Ikan 5	1,65 kg	63,5 cm	10,1 gram	1,5 ml
Rata-rata	1,256 Kg	60,2 cm	8,464 gram	1,34 ml

Dari tabel di atas diketahui bahwa berat rata-rata ikan yang digunakan dalam penelitian adalah sebesar 1,256 kg dengan rata-rata panjang tubuh 60,2 cm. Induk ikan lele dumbo yang digunakan sudah memenuhi kriteria standar indukan. Menurut Anonymous (2000) standar induk jantan ikan lele dumbo

adalah mempunyai panjang standar antara 40 cm - 45 cm dan mempunyai berat badan standar antara 0,5 Kg - 0,75 Kg.

4.1.1 Motilitas Spermatozoa

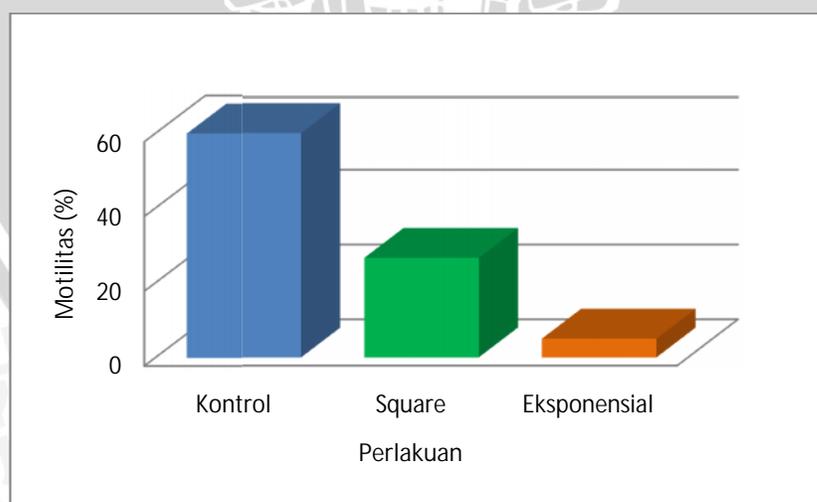
Dari tabel 2 terlihat bahwa motilitas sperma kontrol lebih besar dibandingkan dengan motilitas sperma hasil elektroporasi, ini disebabkan karena sperma kontrol sebelum elektroporasi masih segar dan baik serta tanpa diberi perlakuan apapun. Dari hasil pengamatan didapatkan nilai rata-rata persentase motilitas sperma kontrol adalah sebesar 60%. Nilai motilitas kontrol spermatozoa ikan lele dumbo ini sudah cukup bagus untuk membuahi sel telur.

Hasil persentase motilitas sperma dapat dilihat pada tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Data nilai persentase (%) motilitas sperma ikan lele dumbo

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Kontrol	60	60	60	180	60
Square Wave	20	40	20	80	26,6
Eksponensial Wave	5	10	0	15	5

Untuk lebih jelasnya mengenai persentase rata-rata nilai motilitas dapat dilihat pada Gambar 8 di bawah ini.



Gambar 8. Diagram rata-rata persentase motilitas sperma ikan lele dumbo

Dari diagram tersebut terlihat bahwa nilai rata-rata persentase motilitas perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, dengan nilai 26,6 % untuk square wave, 5% untuk eksponensial dan 60% untuk kontrol. Adanya perbedaan nilai rata-rata motilitas sperma kontrol dengan perlakuan disebabkan karena pada kontrol sperma tidak diberi perlakuan apapun, berbeda dengan perlakuan square dan eksponensial wave yang masing-masing sperma diberi perlakuan kejutan listrik 40 volt. Menurut Evariny (2005) kejutan listrik akan berpengaruh terhadap produksi spermatozoa, sperma yang dikeluarkan dari testis bisa menjadi cacat dan dapat menurunkan tingkat motilitas spermatozoa serta dapat meningkatkan nilai mortalitas dan abnormalitas pada spermatozoa.

Kualitas sperma dengan tingkat motilitas 60 % dapat dikatakan bagus karena menurut Tabares (2007), pada penelitiannya menggunakan ikan *Brycon henni* (ikan air tawar) menunjukkan bahwa pada sperma kontrol memiliki tingkat motilitas 78 % karena dalam cairan seminal plasmanya terdapat ion yang lengkap seperti KCl, NaCl, CaCl₂ dan MgCl₂. Dan fungsi cairan seminal diantaranya; 1) mengembangkan kapasitas sperma dalam bergerak (Mochida *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 2001) dan 2) mempertahankan motilitas sperma saat bergerak dalam air (Morisawa dan Suzuki, 1980; Scott dan Baynes, 1980).

Setelah dilakukan perhitungan statistik terhadap data persentase motilitas (lampiran 3) diperoleh hasil analisa sidik ragam pada Tabel 3.

Tabel 3. Analisa sidik ragam Motilitas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	6706.25	2235.417	35.396**	5.14	10.92
Acak	6	316.667	63.333			
Total	8	7022.917				

Keterangan : (**) Berbeda sangat nyata

Dari hasil perhitungan sidik ragam di atas menunjukkan bahwa perlakuan dua metode yang bebrbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata

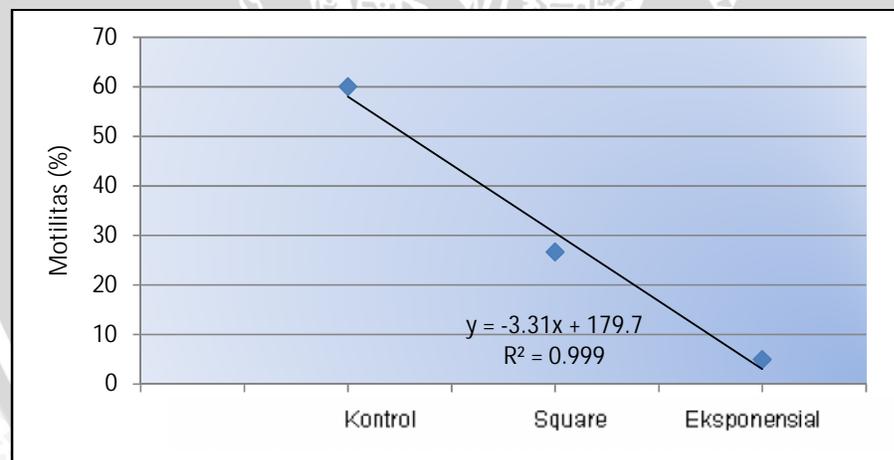
terhadap motilitas sperma ikan lele dumbo. Untuk mengetahui urutan pengaruh perlakuan yang berbeda, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Tabel 4. Uji Beda Nyata (BNT) Motilitas (%).

Rata-rata perlakuan	B (5)	A (26.67)	K (60)	Notasi
B (5)	-	-	-	a
A (26.67)	21.67**	-	-	b
K (60)	55**	33.33**	-	c

Keterangan : (**)= Berbeda sangat nyata

Dari Tabel uji BNT tersebut dapat dilihat bahwa perlakuan B (Eksponensial) berbeda dengan A (Square) dan K (kontrol). Sedangkan perlakuan A berbeda dengan K (kontrol)). Adanya perlakuan yang berbeda memberikan pengaruh yang sangat nyata maka dilanjutkan dengan analisa regresi polinomial ortogonal (Lampiran 3) diperoleh hubungan antara perlakuan perbedaan metode dengan motilitas bersifat linear dengan persamaan $Y = -3,31x + 179,7$ dengan $R^2 = 0,999$ sehingga didapatkan grafik seperti pada Gambar 9 berikut ini.



Gambar 9. Grafik Hubungan Penggunaan Metode Elektroporasi Terhadap Motilitas (%)

Berdasarkan grafik di atas dapat dilihat bahwa penggunaan dua metode (Eksponensial dan Square Wave) dalam elektroporasi memberikan pengaruh yang berbeda terhadap persentase motilitas sperma ikan lele dumbo.

Penggunaan metode Square Wave memiliki persentase motilitas yang lebih tinggi (26,67%) daripada penggunaan metode Eksponensial (5%).

4.1.2 Viabilitas Spermatozoa

Pengamatan viabilitas spermatozoa sangat penting dilakukan, karena nantinya akan dibandingkan dengan nilai viabilitas antar perlakuan. Penilaian viabilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan bahan pewarna *eosin-negrosin*, kemudian diamati viabilitasnya di bawah mikroskop (lampiran 2). Zat pewarna ini akan diserap oleh sel spermatozoa yang mati, sedangkan spermatozoa yang hidup tidak terwarnai atau sedikit sekali menyerap zat warna tersebut. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1981) dalam Yulham (2007) yang menyebutkan bahwa pada saat spermatozoa dicampur dengan zat warna, spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna atau sedikit sekali menyerap zat warna. Sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna dalam jumlah yang sangat banyak, karena permeabilitas dinding sel spermatozoa akan meninggi setelah mati.

Tabel 5. Data nilai persentase (%) viabilitas spermatozoa

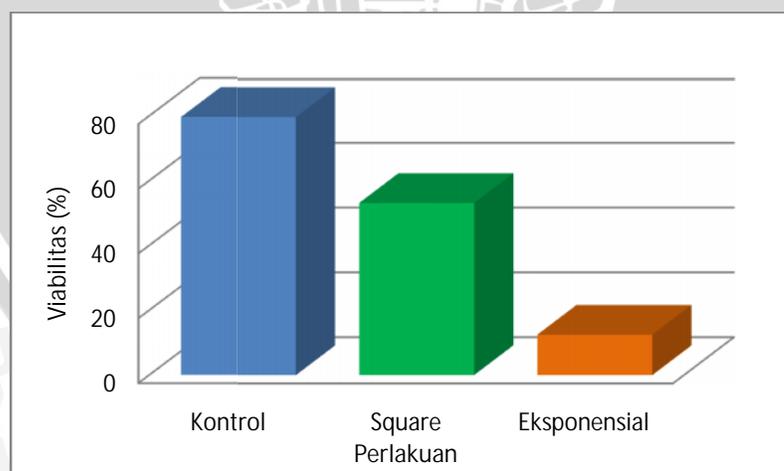
Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Kontrol	87,5	79	72,5	239	79,66
Square Wave	54,5	61,5	43,5	159,5	53,16
Eksponensial Wave	5,5	19,5	12,5	37,5	12,5

Dari tabel di atas terlihat bahwa nilai persentase rata-rata viabilitas sperma kontrol diperoleh hasil sebesar 79,66, sedangkan untuk square wave sebesar 53,16 dan eksponensial sebesar 12,5 %. Nilai ini tergolong baik, karena menurut Anonymous (1998) dalam Yulham (2007) dijelaskan bahwa persentase hidup sel spermatozoa dalam sperma yang baik adalah minimal 70%. Sedangkan nilai rata-rata viabilitas sperma perlakuan lebih rendah dibanding dengan nilai rata

rata viabilitas sperma kontrol, hal ini disebabkan karena sperma kontrol tidak diberi perlakuan apapun.

Menurut Rustidja (1985) dalam Hidayaturrehman (2007), penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit. Penambahan larutan fisiologis tidak dilakukan pada sperma stok (sebelum diberi kejutan) karena mengacu pada penelitian pendahuluan bahwa penambahan pengencer yang mengandung ion dapat meningkatkan suhu (timbul letupan) saat diberi tegangan.

Untuk mempertahankan kondisi sperma yang akan diberi perlakuan yaitu dengan menaruh sperma ditempat dingin seperti dikatakan Anonymous (2006) bahwa sebaiknya sel yang akan dielektroporasi dalam keadaan dingin supaya viabilitasnya tetap terjaga, karena kejutan listrik diberikan pada sel dapat menimbulkan panas yang nantinya dapat mengurangi viabilitas sel. Menurut Toelihere (1981) dalam Rustidja (2000), kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 10 di bawah ini.



Gambar 10. Diagram rata-rata persentase viabilitas sperma ikan lele dumbo

Dari diagram tersebut terlihat bahwa rata-rata persentase viabilitas perlakuan lebih rendah dari pada rata-rata persentase viabilitas kontrol. Sperma kontrol tidak diberi perlakuan apapun, sedangkan sperma square dan eksponensial diberi perlakuan kejutan listrik 40 volt, inilah yang menyebabkan rata-rata persentase motilitas sperma kontrol lebih tinggi. Nilai persentase rata-rata motilitas sperma kontrol 76,66 %, square wave 53,16, dan eksponensial wave 12,5 %. Menurut Weaver (1995), tegangan yang diberikan terhadap sperma menyebabkan terbukanya pori-pori sel membran, akan tetapi dapat juga sel rusak atau pecah yang mengakibatkan sel tersebut mati.

Setelah dilakukan perhitungan statistik (lampiran 3) terhadap data persentase viabilitas diperoleh hasil analisa sidik ragam pada **Tabel 6** sebagai berikut.

Tabel 6. Analisa sidik ragam Viabilitas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	12147.667	4049.278	53.871**	5.14	10.92
Acak	5	481.000	60.125			
Total	8	8268.500				

Keterangan : (**) Berbeda sangat nyata

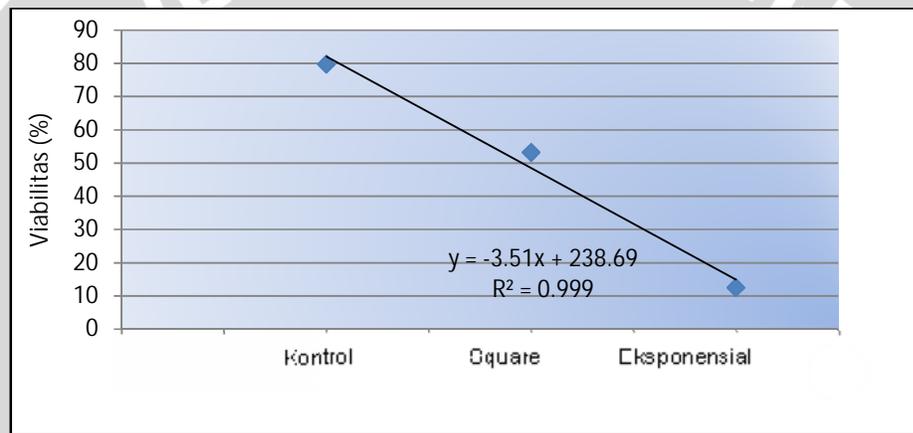
Dari hasil perhitungan sidik ragam di atas menunjukkan bahwa perlakuan dua metode yang bebrbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap viabilitas sperma ikan lele dumbo. Untuk mengetahui urutan pengaruh perlakuan yang berbeda, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 7. Uji Beda Nyata (BNT) Motilitas (%).

Rata-rata perlakuan	B (12.50)	A (53.16)	K (79.66)	Notasi
B (12.50)	-	-	-	a
A (53.16)	40.66**	-	-	b
K (79.66)	67.16**	26.5**	-	c

Keterangan : (**) = Berbeda sangat nyata

Dari Tabel uji BNT tersebut dapat dilihat bahwa perlakuan B (Eksponensial) berbeda nyata dengan A (Square) dan K (kontrol). Sedangkan perlakuan A (Square) berbeda nyata dengan perlakuan K (kontrol). Adanya perlakuan yang berbeda memberikan pengaruh yang sangat nyata maka dilanjutkan dengan analisa regresi polinomial ortogonal (Lampiran 3) diperoleh hubungan antara perlakuan perbedaan metode dengan motilitas bersifat linear dengan persamaan $Y = -3,51x + 238,69$ dengan $R^2 = 0,999$ sehingga didapatkan grafik seperti pada Gambar 11 berikut ini.



Gambar 11. Grafik Hubungan Penggunaan Metode Elektroporasi Terhadap Viabilitas (%).

Berdasarkan grafik di atas dapat dilihat bahwa penggunaan dua metode (Eksponensial dan Square Wave) dalam elektroporasi memberikan pengaruh yang berbeda terhadap persentase viabilitas sperma ikan lele dumbo. Penggunaan metode Square Wave memiliki persentase viabilitas yang lebih tinggi (53,16%) daripada penggunaan metode Eksponensial (12,5%).

4.2 Kualitas Sperma Elektroporasi

Volume sperma yang akan diberi kejutan adalah sebesar 25 μ l, kemudian dimasukkan ke dalam cuvet ukuran 2 mm, lalu diberi perlakuan kejutan listrik. Setelah sperma diberi kejutan listrik, sperma ditambahkan larutan Na Fis

sebanyak 275 μ l agar kondisi sperma relatif stabil serta agar dalam pengambilan sperma lebih mudah. Sperma yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama, karena kondisinya berubah. Oleh karena itu sperma yang telah ditampung diusahakan mempunyai kondisi yang dapat mendukung kehidupannya. Salah satu cara untuk tetap menjaga kualitas sperma adalah dengan melakukan penambahan pengencer Na Fis. Karena menurut Rustidja (1985) dalam Hidayaturrahmah (2007) penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit.

4.2.1 Metode Square Wave

Elektroporasi sperma dengan menggunakan metode *Square Wave* merupakan salah satu metode elektroporasi yang tegangannya lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan yang mana untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol (Sin, 2001). Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Square wave* adalah tegangan, panjang kejutan, jumlah kejutan, dan panjang interval diantara kejutan (Anonymous, 2006).

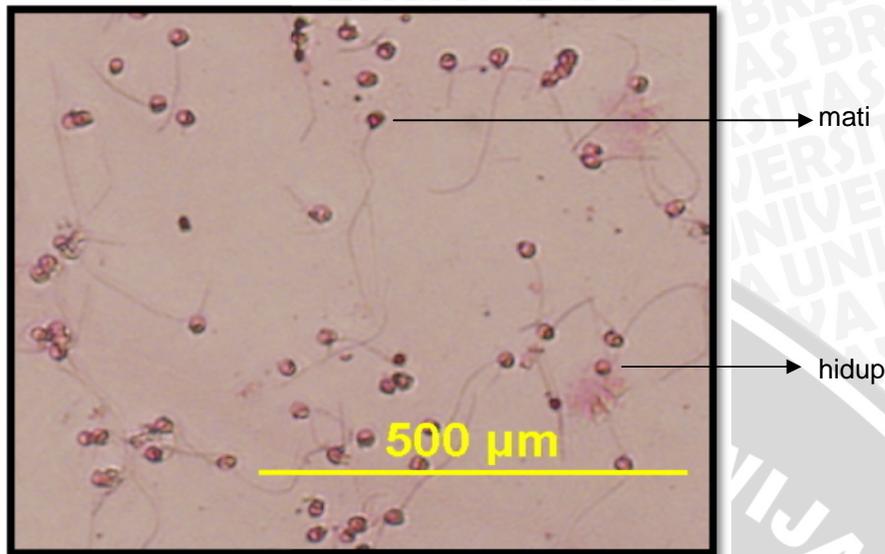
Dari penelitian diperoleh hasil rata-rata nilai persentase motilitas sperma ikan lele setelah diberi perlakuan kejutan listrik dengan tegangan 40 volt menggunakan metode *Square Wave* adalah 26,66%. Nilai persentase motilitas ini lebih kecil bila dibandingkan dengan persentase sperma kontrol sebelum diberi perlakuan kejutan listrik sebesar 60%, akan tetapi lebih besar dari hasil persentase motilitas sperma dengan menggunakan metode Eksponensial Wave.

Penurunan motilitas ini dapat diakibatkan karena terjadinya adaptasi antara spermatozoa dengan tegangan sehingga mengakibatkan terjadinya gangguan terhadap permeabilitas membran atau selaput sperma yang dapat menurunkan aktivitas metabolisme, kerusakan sel dan penurunan motilitas. Hal ini sesuai

dengan pendapat Jeyendran (1986) yang menyatakan bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa karena seperti yang diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting perannya dalam metabolisme sel. Ditambahkan oleh Tsai (2000) yang menyatakan bahwa motilitas sperma yang diperoleh sangat tergantung pada level tegangan selama elektroporasi.

Sedangkan untuk nilai persentase viabilitas sperma ikan lele setelah diberi kejutan yang sama diperoleh rata-rata sebesar 53,16%. Nilai persentase ini juga lebih kecil bila dibandingkan dengan rata-rata persentase motilitas sperma kontrol sebelum diberi perlakuan yaitu sebesar 79,66%, akan tetapi masih lebih besar dibanding dengan persentase viabilitas dengan menggunakan metode Eksponensial wave. Adanya penurunan nilai viabilitas sperma yang dapat disebabkan karena pemberian kejutan listrik dengan tegangan tinggi yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma dan penurunan motilitas sperma.

Maxwell dan Watson (1996) menyatakan bahwa kerusakan membran spermatozoa akan berdampak pada membran yang pada awalnya mempunyai sifat permeabel tidak lagi mampu menyeleksi keluar masuknya zat, yang akhirnya pada saat dilakukan uji warna eosin-negrosin zat tersebut bisa masuk ke dalam plasma. Ditambahkan oleh Tang dan Affandi (2001) dalam Yulham (2007) permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Apabila spermatozoa tersebut mati maka permeabilitas membrannya meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dengan spermatozoa yang mati. Untuk lebih jelasnya tentang viabilitas sperma dapat dilihat pada gambar 12 berikut ini.



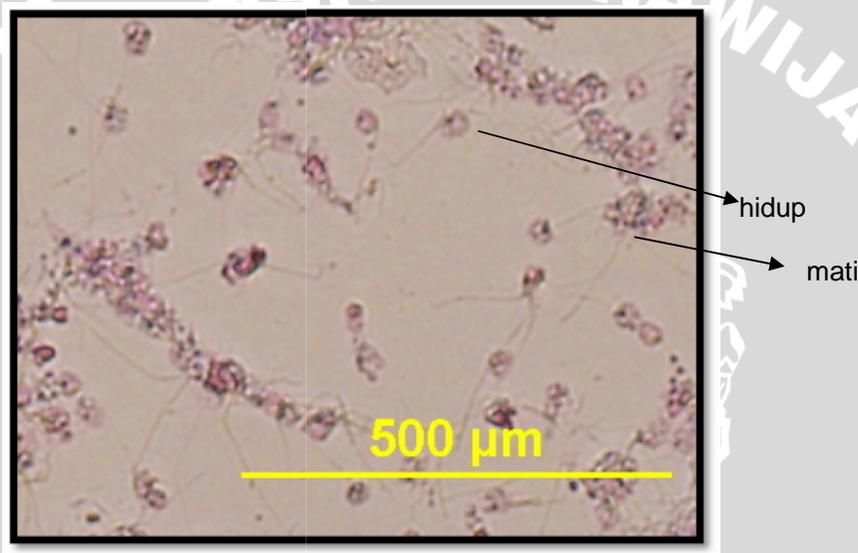
Gambar 12. Viabilitas sperma ikan lele pada metode *Square Wave*

4.2.2 Metode Eksponensial Wave

Sementara elektroporasi sperma dengan metode *Eksponensial Wave* merupakan salah satu metode elektroporasi dengan menaikkan voltase sampai pada amplitudo yang diinginkan kemudian menurun secara eksponensial (Sin, 2001). Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Eksponensial* adalah tegangan, waktu dan kekuatan bidang. *Eksponensial wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen. Pada metode ini panjang kejutan memiliki nilai yang sama dengan lama kejutan (Anonymous, 2006).

Dari penelitian diperoleh hasil rata-rata nilai motilitas sperma ikan lele setelah diberi perlakuan kejutan listrik dengan tegangan 40 volt menggunakan metode *Eksponensial Wave* adalah sebesar 15%. Nilai persentase motilitas ini jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan persentase sperma kontrol sebelum diberi perlakuan kejutan listrik sebesar 60%. Begitu juga dengan nilai rata-rata persentasi viabilitasnya juga jauh lebih rendah dibandingkan dengan rata-rata

persentase sperma kontrol sebelum diberi kejutan listrik dengan metode *eksponensial*. Menurut Nakamura (2009) menyebutkan bahwa penggunaan tegangan listrik tinggi yang diberikan pada sampel dapat menyebabkan produksi panas oleh generator yang bisa membunuh sebagian besar sampel yang dielektroporasi. Untuk lebih jelasnya tentang gambar sperma ikan lele dumbo hasil elektroporasi dengan metode *Eksponensial Wave* dapat dilihat (lampiran 2) pada gambar 13 berikut ini.



Gambar 13. Viabilitas sperma ikan lele pada metode *Eksponensial Wave*

4.2.3 Perbandingan Metode *Square Wave* dan *Eksponensial Wave*

Berdasarkan hasil yang didapat dari perlakuan pemberian kejutan menggunakan dua metode elektroporasi yang berbeda diperoleh rata-rata persentase motilitas dan viabilitas dari penggunaan metode *Square Wave* ternyata lebih besar daripada persentase motilitas dan viabilitas dari penggunaan metode *Eksponensial Wave*. Kemungkinan kerusakan sel spermatozoa pada metode *Square Wave* lebih kecil dibanding dengan metode *Eksponensial*. Chen *et al* (2009) menyatakan bahwa metode *Square* dapat menghasilkan tegangan

yang besar sehingga efisiensi pemasukkan DNA asing lebih besar karena pembukaan pori relatif lebih besar, namun gelombangnya sangat pendek (*pulse length*) sehingga mencegah sel rusak dan dapat kembali seperti semula karena panas yang ditimbulkan relatif kecil. Sehingga dapat dikatakan metode *square wave* dapat menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga transfer DNA dapat terjadi tanpa membunuh sel atau embrio. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Saunders *et al.* (2002) bahwa penggunaan dua metode dalam elektroporasi (Eksponensial maupun Square Wave) akan menimbulkan efek pada suatu sel, akan tetapi pada penggunaan metode Square Wave memiliki persentase bertahan hidup yang lebih besar pada sel yang dielektroporasi.

Pada metode Square Wave dicirikan dengan tegangan (*voltase*), panjang kejutan (*pulse length*), jumlah kejutan (*number of pulse*) dan jarak antara kejutan (*pulse interval*). Sedangkan pada metode *Eksponensial Wave* dicirikan dengan tegangan (*voltase*), ketahanan (*capacitance*) hambatan (*resistence*) dan waktu yang konstan (TC). Dari perlakuan elektroporasi dengan menggunakan tegangan 40 volt pada metode Square Wave menghasilkan tegangan akhir 37 volt, panjang gelombang 0,5 ms, jumlah kejutan 1 dan persentase penurunan tegangan (Droop) 0,075%. Selanjutnya pada metode *Eksponensial* menghasilkan tegangan akhir 37 volt dan waktu konstan atau "*time constan*" (TC) 10,4 ms. Pada metode ini panjang kejutan memiliki nilai yang sama dengan lama kejutan.

Berdasarkan hasil diatas diketahui bahwa lama kejutan atau panjang kejutan (*pulse lenght*) metode *Eksponensial Wave* lebih besar daripada Metode *Square Wave*, sehingga metode *Eksponensial* menghasilkan panas yang lebih besar yang mengakibatkan rusaknya sel spermatozoa. Lamanya kontak dengan sengatan listrik berbanding lurus dengan pemanasan elektrotermal dan derajat kerusakan jaringan yang terkena. Menurut Nilandari (2009), waktu paparan yang

semakin besar menyebabkan semakin banyak energi yang dihantarkan ke jaringan, apabila jaringan tidak mampu menghilangkan energi ini, jaringan akan memanas sampai terbakar.

Dari uji statistik didapatkan bahwa perlakuan perbedaan dua metode berbeda sangat nyata, dengan F hitung $> F$ 1% yang dapat dilihat pada lampiran 3. Dari kedua metode tersebut tampak bahwa penggunaan metode *Square Wave* lebih baik dari pada Metode *Eksponensial Wave*. Hasil ini diperkuat dengan nilai persentase motilitas dan viabilitas metode *Square Wave* sperma ikan lele dumbo yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode *Eksponensial*.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil perhitungan dan analisa data pada penelitian ini dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut :

- Lama kejutan atau panjang kejutan (*pulse length*) metode *Eksponensial Wave* lebih besar daripada Metode *Square Wave*, sehingga metode Eksponensial menghasilkan panas yang lebih besar yang mengakibatkan rusaknya sel spermatozoa
- Metode *Square wave* dapat menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga transfer DNA dapat terjadi tanpa membunuh sel atau embrio.
- Dari kedua metode tersebut dapat disimpulkan bahwa penggunaan metode *Square Wave* yang memiliki persentase motilitas sebesar 26,6% dan viabilitas 53,16% lebih baik dari pada Metode *Eksponensial Wave* yang memiliki persentase motilitas 5% dan viabilitas 12,5%. Hasil ini diperkuat dengan nilai persentase motilitas dan viabilitas sperma ikan lele yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode Eksponensial.

5.2 Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang sperma hasil elektroporasi dengan metode Eksponensial maupun Square wave terhadap fertilitas sel telur.

DAFTAR PUSTAKA

- Andre, F.M, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Gotzio, M. Cemazar, N. Pavscl, M.P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumann, J. Teissie and L.M. Mir. 2008. **Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor and Skin**. Diakses dari <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/hum.2008.060> pada tanggal 12 Februari 2010 pukul 10:27 WIB
- Anonymous. 2006. **Gene Pulser Xcell Electroporation System**. Instruction Manual. BIO-RAD. Diakses tanggal 20 Mei 2010 pukul 19.05 WIB
- _____. 2007. **Lele Dumbo (Clarias gariepinus)**. <http://gandainc.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 20 Mei 2010 pukul 19:10 WIB.
- _____. 2008. Struktur Sperma. <http://biodea.blogspot.com/2008/10/struktur-sperma.html> 2008
- Arie. 2008. **Budidaya Ikan Mas (Cyprinus carpio L.)**. <http://solusiikanmas.blogspot.com/2008/04/sperma-ikan-mas.html>. Diakses tanggal 11 Maret 2010 pukul 18.37 WIB.
- Carman, O. 1990. **Ploidy manipulation in some warm water fish**. Thesis, Sumited in Partial Fulfillment of Requirements for Degree of Master in Fisheries Science at The Tokyo University of Fisheries, 87 hal.
- Chent, T.T, Marsh, A. Shambloott, M.G. Villasenor, L.I. Powers and D.A. Wood. 1995. **Structure and Evolution of Fish Growth Hormone and Insulin – Like Growth Factor Genes in Fish Physiology**. PP 179 – 209.
- Evariny, A. 2005. **Gali Soal Sperma Lebih Dalam**. astaga.com Selasa, 15 November. <http://www.hypno-birthing.web.id/?p=160>.
- Fujaya, Y. 2004. **Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta. 179 hal
- Hermawanto, H. H. 2008. **Analisis Sperma Pada Infertilitas Pria**. RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang. 26 Juli. 10.36 pm. <http://kamuseliz.wordpress.com/>. Diakses pada tanggal 07 Maret 2010 pukul 21.43 WIB.
- Hidayaturrehman. 2007. **Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (Cyprinus carpio L.) Pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa**. Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat. Kalsel. Hal 9 – 18. <http://www.unlam.ac.id/bioscientiae>. Diakses pada tanggal 01 Januari 2010 pukul 07:56 WIB.
- Jatilaksono. 2007. **Ginogenesis Ikan Lele (Clarias sp)**. aquaculture 7:34:00 PM. <http://jlcome.blogspot.com/2007/06/ginogenesis-ikan-lele-clarias-sp.html>. Diakses pada tanggal 03 Juni 2010 pukul 10.14 WIB

- Kang, H.J., G. Yoshizaki, O. Homma, Charlos, A. Strusmann, F. Takasima. 1999. **Effect of Osmotic Differential on the Efficiency of Gene Transfer by Elektroporation of Fis Spermatozoa**. *Aquaculture* 173. page 297 – 307.
- Khairuman. 2008. **Buku Pintar Budidaya 15 Ikan Konsumsi**. Agromedia. Jakarta. 358 hal.
- Lavitrano, M., Marcho, B. Maria, G.C. Roberto, G. Stefano and Alessia. 2006. **Sperm Mediated Gene Transfer, Reprod. Fertility and Development 18**. CSIRO Publishing. Page 19 – 23.
- Muller, F., Ivich, Z. Erdelyi, F. Papp, T. Varadi, L. Horvart and Maclean. 1992. **Introducing Foreign Gene Into Fish Eggs With Electroporated Sperm as Carrier**. *Mol. Biol. Biotechnol.* 1. page 276 – 281.
- Najiyati, S. 1992. **Memelihara Lele Dumbo Di Kolam Tanah**. Penebar Swadaya. Jakarta. 48 hal.
- Nilandari. 2009. **Perbedaan Kerusakan Otot Ektremitas Tikus Wistar Akibat Paparan Arus Listrik Secara Langsung Dan Melalui Media Air**. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang
- Ningrum, D.R. 2006. **Pengaruh Fase Air Daun Gendarusa Vulgaris Nees Terhadap Motilitas, Viabilitas dan Konsentrasi Spermatozoa**. Theses Airlangga University. Surabaya. Diterbitkan pada tanggal 08 November. <http://www.adln.lib.unair.ac.id>
- Paisal. 2008. **Pemeriksaan Sperma**. 07 September 2008. <http://www.wartamedika.com/2008/09/pemeriksaan-sperma.html>. Diakses pada tanggal 09 Juni 2010 pukul 07:55 WIB.
- Partodihardjo. 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Jakarta.
- Prihartono, R.E., Rasidik dan Arie. 2000. **Mengatasi Permasalahan Budidaya Lele Dumbo**. Penebar Swadaya. Jakarta. 86 hal.
- Rachman, A. 2003 **Sistem Organ Pernafasan, Peredaran Darah, Ekskresi, Reproduksi, Syaraf dan Hormon**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang
- Rizky, M. 2009. **Pengaruh Pemberian Kejut Listrik Dengan Tegangan Yang Berbeda Terhadap Motilitas, Viabilitas, Dan Daya Fertilitas Sperma Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)**. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang
- Rustidja. 1997. **Kromosom Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Polypoid**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 67 hal.
- _____. 1999. **Pemisahan Spermatozoa X dan Y Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 76 hal.

- _____. 2000. **Prospek Pembekuan Sperma**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 68 hal.
- _____. 2006. **Diktat Kuliah Breeding dan Reproduksi Hewan Air**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang
- _____. 2007. **Pengamatan Histologi Reproduksi, Preservasi dan Uji Motilitas**. Laporan Praktikum Mata Kuliah Fisiologi Reproduksi. <http://mahasiswa.blogspot.com/2007/12/pengamatan-histologi-reproduksi.html>. Diakses tanggal 17 April 2010 pukul 08:17 WIB.
- Salisbury, G.W. dan L.A.V. Denmark. 1985. **Fisiologi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi**. Djanuar R. (Terjemahan). Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Saanin, H. 1984. **Taksionomi dan Kunci Identifikasi Ikan**. Bina Cipta. Bandung. 40 hal.
- Sin, F.Y.T., S.P. Walker, J.E. Symonds, F.Y.T. Sin. 2008. **Sperm Mediated Gene Transfer in Chinook Salmon**. Diakses dari <http://www.heb.pac.dfo-mpo.gc.ca>. Diakses pada tanggal 21 April 2010 pukul 19:06 WIB.
- Sastrosupadi, A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian**. Kanisius. Yogyakarta. 276 hal.
- Sulistyowati. 2003. **Diktat Kuliah Rancangan Percobaan Penelitian**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 4 – 5
- Susanto, H. 1988. **Budidaya Ikan Lele**. Kanisius. Yogyakarta. 71 hal.
- Suyanto, S.R. 2006. **Budidaya Ikan Lele (Cetakan XXXII)**. Penebar Swadaya. Jakarta. 100 hal.
- Symond, J.E., S.P. Walker and F.Y.T. Sin. 1994. **Development of Mass Gene Transfer Method in Chinok Salmon ; Optimazation of Gene Transfer by Elektroporated Sperm**. Mol. Mar. Biol. Biotech 3. page 104–111.
- Tang, M.U dan R. Affandi. 2001. **Biologi reproduksi Ikan**. P2KP2 UNRI. Riau.165 hal/
- Toelihere, M.R. 1985. **Fisiologi Reproduksi Pada Ternak**. Angkasa. Bandung.
- Tsai, H.J., C. Lai and H.S. Yang. 1997. **Sperm as Carrier to Introduce an Exogenous DNA Fragment Into Oocyte of Japanese Abalone Transgenics**. Res. 8. 313 – 315.
- Weaver, J.C. 1993. **Electroporation: A General Phenomenon For Manipulating Cells and Tissues**. J. Cell Biochem. 51: Page 426-435.

Wira. 2007. **Tingkah Laku Pemijahan Biota akuatik (part 2)**. Diakses dari <http://maswira.blogspot.com> Diakses pada tanggal 21 Maret 2010 pukul 14:59 WIB.

Yulham, H. 2007. **Pengaruh Penambahan Gliserol Pada Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Pada Pembekuan Suhu - 196°C**. Laporan Penelitian Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 110 hal.



LAMPIRAN

Lampiran 1.

Gambar Sperma Lele Dumbo (*Clarias spp*), perbesaran 400 x



Keterangan :

1. Diameter kepala : ± 19,6 µm
2. Panjang leher : ± 20,5 µm
3. Panjang ekor : ± 191,3 µm
4. Panjang total : ± 210,9 µm

Perhitungan Konsentrasi Jumlah Sperma Ikan Lele

Sperma diencerkan 100 x, caranya dengan menambah/ mencampur volume sperma sebanyak 10 µl dengan Na fis sebanyak 990 µl. Dari pengamatan 5 bidang pandang pada hemocytometer didapatkan jumlah sperma:

Bidang Pandang	Jumlah Sel Sperma
I	276
II	249
III	291
IV	252
V	306
Total	1374

Setelah didapatkan data jumlah sel sperma pada setiap bidang pandang, kemudian dapat dihitung jumlah sel sperma dengan cara jumlah sel sperma pada 5 bidang pandang tersebut dijumlah kemudian dibagi 5 bidang pandang dan dikalikan 16 serta dikalikan 10^4 dan dikali pengenceran, diketahui pengenceran yang digunakan adalah $100x (10^2)$. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat perhitungan di bawah ini :

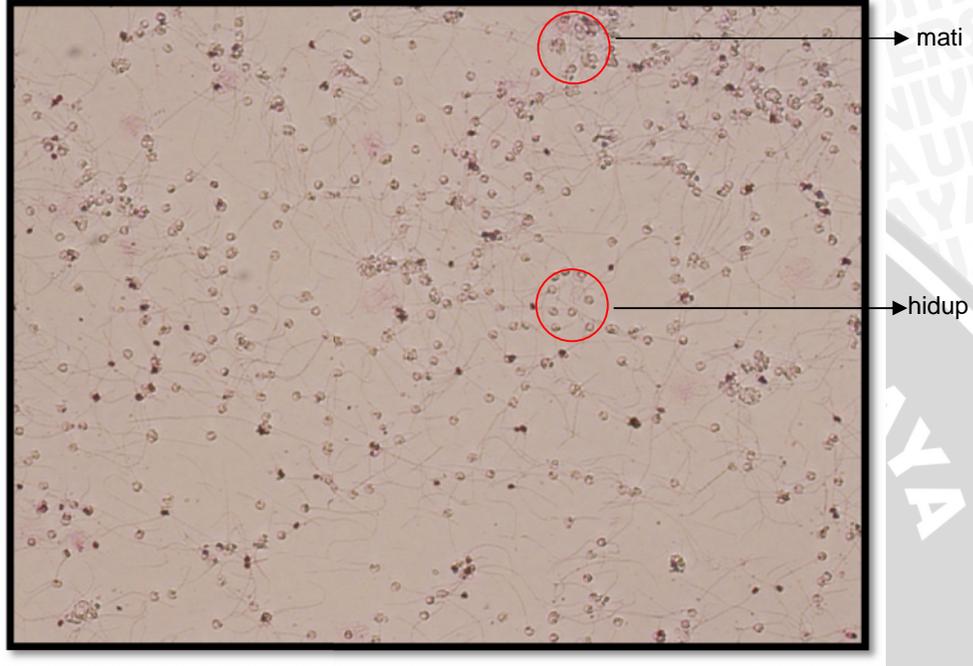
$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi sperma} &= \frac{1374}{5} \times 16 \times 10^4 \times 10^2 \\ &= 4396,8 \times 10^6 \text{ sel/ml} \\ &= 4,3 \times 10^9 \text{ sel/ml}\end{aligned}$$



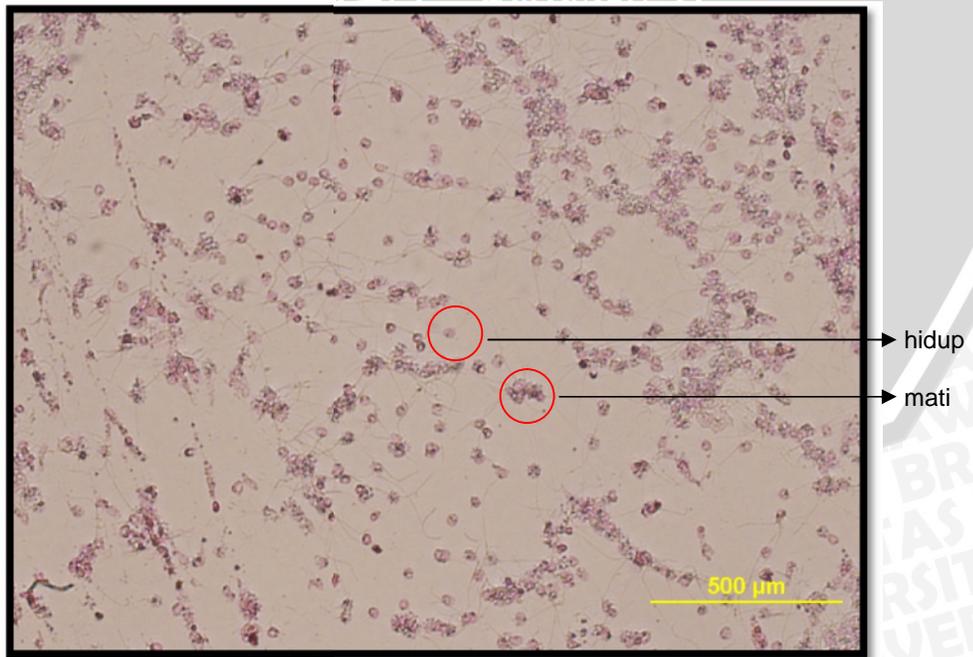
Lampiran 2.

Sperma Hasil Elektroporasi

Gambar sperma hasil elektroporasi dengan menggunakan Metode *Square Wave*.



Gambar sperma hasil elektroporasi dengan menggunakan Metode *Eksponensial Wave*.



Lampiran 3.

Motilitas

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata	Total (kuadrat)
	1	2	3			
A	20	40	20	80	26.67	6400
B	5	10	0	15	5	225
K	60	60	60	180	60	32400
Total				275		39025

Perhitungan Jumlah Kuadrat (JK) :

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{G^2}{n} = \frac{275^2}{9} = 8302.08$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + K3^2 - FK \\ &= 20^2 + 40^2 + 20^2 + \dots + 60^2 - 8302.08 \\ &= 7022.917 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= \frac{(\sum A)^2}{rA} + \frac{(\sum B)^2}{rB} + \frac{(\sum C)^2}{rC} - FK \\ &= \frac{(80)^2}{3} + \frac{(15)^2}{3} + \frac{(180)^2}{3} - 7022.917 \\ &= 6706.25 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 7022.917 - 6706.25 \\ &= 316.667 \end{aligned}$$

Tabel analisa sidik ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	6706.25	2235.417	35.396**	5.14	10.92
Acak	6	316.667	63.333			
Total	8	7022.917				

Keterangan : (**) Berbeda sangat nyata

Uji Beda Nyata Terkecil :

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{\frac{2KTA_{acak}}{3}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 63.333}{3}} \\ &= 6.497 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t \text{ tabel 5\% (db acak)} \times \text{SED} \\ &= 2.447 \times 6.497 \\ &= 15.89 \end{aligned}$$

Created with

$$\begin{aligned} \text{BNT } 1\% &= t \text{ tabel } 1\% (\text{db acak}) \times \text{SED} \\ &= 3.707 \times 6.497 \\ &= 24.08 \end{aligned}$$

Tabel Uji Beda Nyata (BNT)

Rata-rata perlakuan	B (5)	A (26.67)	K (60)	Notasi
B (5)	-	-	-	a
A (26.67)	21.67**	-	-	b
K (60)	55**	33.33**	-	c

Keterangan : (ns) = Tidak berbeda nyata
 (*) = Berbeda nyata
 (**) = Berbeda sangat nyata

Tabel Polinomial Ortogonal

Perlakuan	Data (Ti)	Regresi linear(Ci)	Regresi kuadrat
K	180	-1	1
A	80	0	-2
B	15	1	1
Q= CiTi		-165	35
Kr= (Ci ²)r		6	18
JK		4537.500	68.056

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hit	F tabel 5%	F tabel 1%
perlakuan	2	4605.556	2302.778			
linear	1	4537.5	4537.5	318793.911**	5.99	13.74
kuadrat	1	68.056	68.056	4781.452**		
acak	6	0.085	0.014			
total	8					

Keterangan : (**) = Berbeda sangat nyata

Dari hasil sidik ragam ternyata F hitung linier dan F hitung kuadrat berada > F 1 % (berbeda sangat nyata). Oleh karena itu regresi linearlah yang sesuai, maka selanjutnya dihitung R² :

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Linear} &= \frac{JK_{\text{Linear}}}{JK_{\text{Linear}} + JK_{\text{Acak}}} \\ &= \frac{4537.5}{4537.5 + 0.085} \\ R^2 &= 0,999 \\ r &= 0,999 \end{aligned}$$

Untuk mencari persamaan linear :

X	Y	XY	X ²
0	180	0	0
40	80	3200	1600
40	15	600	1600
X = 80 $\bar{X} = 26.6$	Y = 275 $\bar{Y} = 91.6$	XY = 3800	X² = 3200

$$b_1 = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \cdot \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} = \frac{3800 - \frac{22000}{3}}{3200 - \frac{6400}{3}} = -3,31$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \cdot \bar{X} = 91,6 - (-3,31) \cdot 26,6$$

$$= 91,6 + 88,1$$

$$= 179,7$$

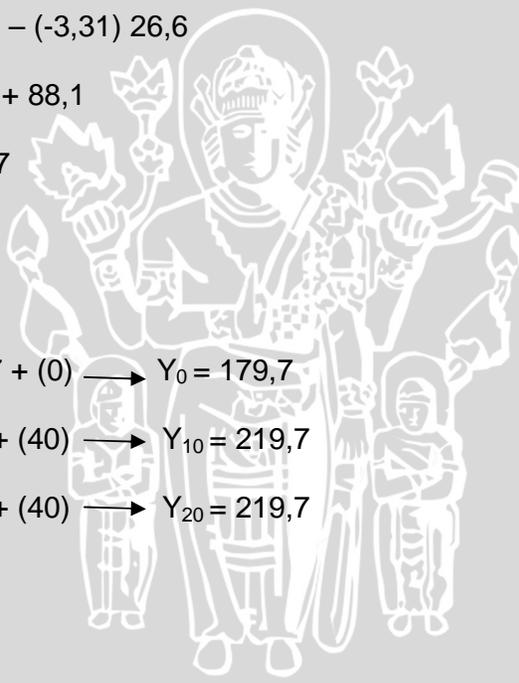
$$Y = b_0 + b_1 \cdot x$$

$$Y = 179,7 - 3,31x$$

$$X_0 \longrightarrow y_0 = 179,7 + (0) \longrightarrow Y_0 = 179,7$$

$$X_{40} \longrightarrow y_{10} = 271 + (40) \longrightarrow Y_{10} = 219,7$$

$$X_{40} \longrightarrow y_{20} = 271 + (40) \longrightarrow Y_{20} = 219,7$$



Viabilitas

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata	Total (kuadrat)
	1	2	3			
A	54.5	61.5	43.5	159.50	53.16	25440.25
B	5.5	19.5	12.5	37.50	12.50	1406.25
K	87.5	79	72.5	239.00	79.67	57121.00
Total				436.00		83967.50

Perhitungan Jumlah Kuadrat (JK) :

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{G^2}{n} = \frac{436^2}{9} = 15841.33$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + K3^2 - FK \\ &= 54.5^2 + 61.5^2 + 43.5^2 + \dots + 72.5^2 - 15841.33 \\ &= 8268.500 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= \frac{(\sum A)^2}{rA} + \frac{(\sum B)^2}{rB} + \frac{(\sum C)^2}{rC} - FK \\ &= \frac{(53.17)^2}{3} + \frac{(12.50)^2}{3} + \frac{(79.67)^2}{3} - 8268.500 \\ &= 12147.667 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 8268.5 - 12147.667 \\ &= 481 \end{aligned}$$

Tabel analisa sidik ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	12147.667	4049.278	53.871**	5.14	10.92
Acak	5	481.000	60.125			
Total	8	8268.500				

Keterangan : (**) Berbeda sangat nyata

Uji Beda Nyata Terkecil :

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{\frac{2KTA_{acak}}{3}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 60.125}{3}} \\ &= 6.33 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t \text{ tabel 5\% (db acak) } \times \text{SED} \\ &= 2.447 \times 6.33 \\ &= 15.489 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= t \text{ tabel 1\% (db acak) } \times \text{SED} \\ &= 3.707 \times 6.33 \\ &= 23.465 \end{aligned}$$

Tabel Uji Beda Nyata (BNT)

Rata-rata perlakuan	B (12.50)	A (53.16)	K (79.66)	Notasi
B (12.50)	-	-	-	a
A (53.16)	40.66**	-	-	b
K (79.66)	67.16**	26.5**	-	c

Keterangan : (ns) = Tidak berbeda nyata
 (*) = Berbeda nyata
 (**) = Berbeda sangat nyata

Tabel Polinomial Ortogonal

Perlakuan	Data (Ti)	Regresi linear(Ci)	Regresi kuadrat
K	79.67	-1	1
A	53.16	0	-2
B	12.5	1	1
Q= CiTi		-67.17	-14.15
Kr= (Ci)²r		6	18
JK		751.968	11.123

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hit	F tabel 5%	F tabel 1%
perlakuan	2	763.092	381.546			
linear	1	751.968	751.968	52831.475**	5.99	13.74
kuadrat	1	11.123	11.123	781.475**		
acak	6	0.085	0.014			
total	8					

Keterangan : (**) = Berbeda sangat nyata

Dari hasil sidik ragam ternyata F hitung linier dan F hitung kuadratik berada > F 1 % (berbeda sangat nyata). Oleh karena itu regresi linearlah yang sesuai, maka selanjutnya dihitung R² :

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Linear} &= \frac{JK_{\text{Linear}}}{JK_{\text{Linear}} + JK_{\text{Acak}}} \\ &= \frac{751.968}{751.968 + 0.085} \\ R^2 &= 0,999 \\ r &= 0,999 \end{aligned}$$

Untuk mencari persamaan linear :

X	Y	XY	X ²
0	239	0	0
40	159.5	6380	1600
40	37.5	1500	1600
X = 80 $\bar{X} = 26.6$	Y = 436 $\bar{Y} = 145.33$	XY = 7880	X² = 3200

$$b_1 = \frac{XY - \frac{X \cdot Y}{n}}{X^2 - \frac{(X)^2}{n}} = \frac{7880 - \frac{34880}{3}}{3200 - \frac{6400}{3}} = -3,51$$

$$b_0 = Y - b_1 \cdot X = 145,33 - (-3,51) \cdot 26,6$$

$$= 145,33 + 93,36$$

$$= 238,69$$

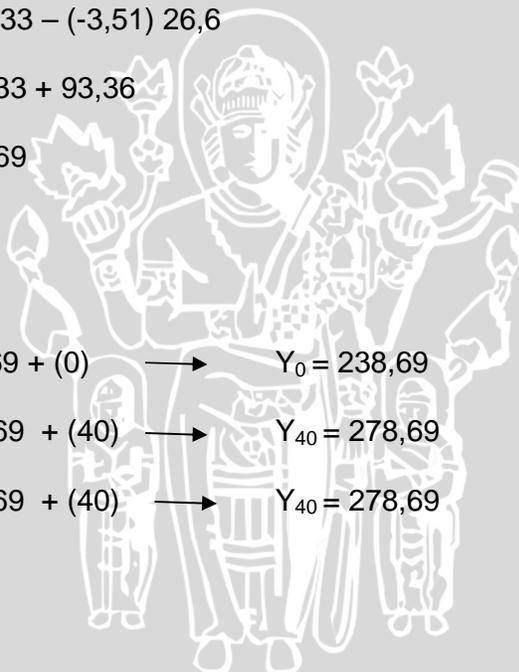
$$Y = b_0 + b_1 \cdot x$$

$$Y = 238,69 - 3,51x$$

$$X_0 \longrightarrow y_0 = 238,69 + (0) \longrightarrow Y_0 = 238,69$$

$$X_{40} \longrightarrow y_{10} = 238,69 + (40) \longrightarrow Y_{40} = 278,69$$

$$X_{40} \longrightarrow y_{20} = 238,69 + (40) \longrightarrow Y_{40} = 278,69$$

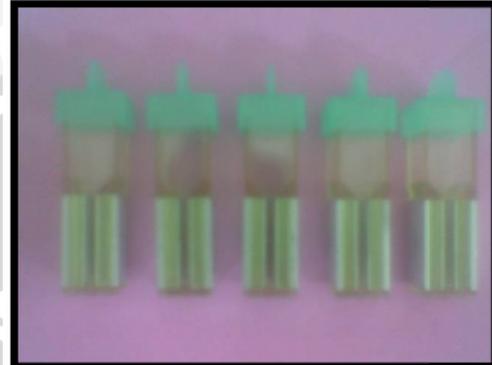


Lampiran 4.

Gambar Alat-alat yang digunakan Pada Saat Penelitian



Elektroporator Gene Pulser



Cuvet dengan ukuran 2 mm



Pengukur panjang ikan



Timbangan digital "Mettler PE 22"



Mikroskop



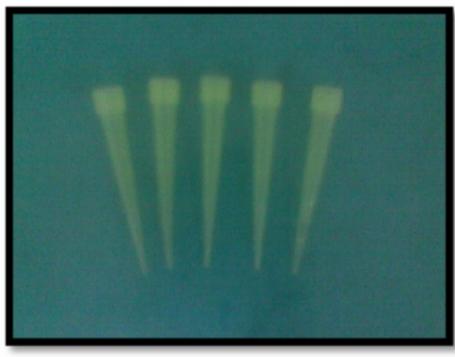
Mikroskop "Olympus BX 51" Tipe DIC



Mikropipet



Petridisk



Yellow Tip



Sectio (Gunting dan Pinset)



Haemocytometer



Cover Glass



Obyek Glass



Timbangan Digital "AND EK 610"

Created with



Handtally counter

Lampiran 5.

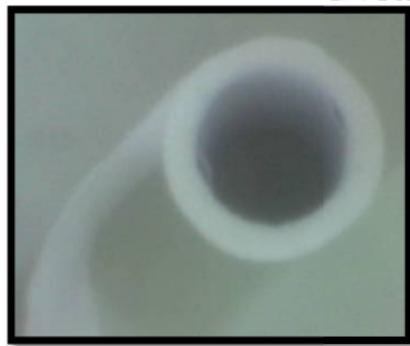
Gambar Bahan Yang Digunakan Saat Penelitian



Gonad Ikan Lele Jantan



Na Fisiologi



Tisu