

**PENGARUH PEMBERIAN TEGANGAN 40 VOLT DENGAN LAMA DAN
FREKUENSI KEJUTAN YANG BERBEDA TERHADAP MOTILITAS DAN
VIABILITAS SPERMA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)**

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

Oleh :
SEPTI ANITASARI
NIM. 0510850058



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2010

PENGARUH PEMBERIAN TEGANGAN 40 VOLT DENGAN LAMA DAN FREKUENSI KEJUTAN YANG BERBEDA TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

Oleh :

SEPTI ANITASARI

NIM. 0510850058

Dosen Penguji I

**Menyetujui,
Dosen Pembimbing I**

(Dr. Ir. AGOES SOEPRIJANTO, MS)

(Ir. ABD RAHEM FAQIH, M.Si)

Tanggal:

Tanggal :

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

(Ir. PURWOHADIJANTO)

(Ir. SOELISTYOWATI)

Tanggal :

Tanggal :

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

(DR. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

Tanggal :

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



DAFTAR ISI

halaman

RINGKASAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Perumusan masalah.....	2
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.4 Kegunaan penelitian.....	4
1.5 Hipotesis.....	5
1.6 Tempat dan waktu.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Biologi ikan Mas (<i>Cyprinus carpio L</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi.....	6
2.1.2 Morfologi.....	6
2.1.3 Habitat dan kebiasaan hidup.....	7
2.1.4 Daerah Penyebaran.	8
2.2 Ciri-ciri induk ikan mas yang matang gonad.....	8
2.2.1 Induk jantan.....	9
2.2.2 Induk betina.....	9
2.3 Spermatozoa.....	10
2.3.1 Proses Spermatogenesis.....	12
2.3.2 Pengambilan Sperma ikan mas.....	13
2.3.3 Buffer sperma	14
2.3.4 Konsentrasi spermatozoa.....	14
2.3.5 Kandungan Sperma ikan mas.....	15
2.3.6 Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa..	16
2.4 Hubungan Viabilitas dan motilitas.....	19
2.5 Metode Elektroporasi.....	19
2.6 Elektroporasi Sperma sebagai media transfer gen.....	23
3. MATERI DAN METODE.....	26
3.1 Materi penelitian.....	26
3.1.1 Bahan.....	26
3.1.2 Alat.....	26
3.2 Metode Penelitian.....	28
3.3 Rancangan penelitian.....	28
3.4 Prosedur penelitian.....	32
3.5 Parameter uji penelitian.....	33
3.5.1 Parameter utama.....	33
3.5.2 Parameter penunjang.....	34
3.6 Analisa data.....	35

4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1 Kualitas Spermatozoa	36
4.1.1 Motilitas Sperma Kontrol	36
4.1.2 Viabilitas Sperma Kontrol	37
4.2 Kualitas Spermatozoa Setelah Elektroporasi.....	38
4.2.1 Motilitas spermatozoa	39
4.2.2 viabilitas spermatozoa	42
4.3 Daya fertilisas sperma.....	47
4.4 Daya Tetas Telur (HR)	51
4.5 Hasil Pengamatan Keseluruhan Parameter (Motilitas, Viabilitas, Daya Fertilitas Sperma dan Daya Tetas Telur.....	53
4.5.1 Motilitas Dengan Viabilitas Sperma	53
4.5.2 Motilitas Dengan Daya Fertilitas Sperma.....	53
4.5.3 Viabilitas Dengan Daya Fertilitas Sperma.....	54
4.5.4 Daya Fertilitas Dengan Daya Tetas Telur.....	55
4.4 Kualitas Air.....	56
4.6.1 Suhu.....	56
4.6.2 Oksigen Terlarut (DO)	56
4.6.3 Derajat Keasaman.....	57
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	58
5.1 Kesimpulan.....	58
5.2 Saran.....	59

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kelestarian sumber hayati akan terganggu jika penangkapan ikan dilakukan secara besar-besaran tanpa mengindahkan norma-norma konservasi. Jika kita mengharapkan agar hasil perairan tetap dapat dinikmati, maka sudah sewajarnya kita kembangkan usaha budidaya perairan. Dengan budidaya perikanan kita sudah menunjukkan perwujudan yang paling sederhana dan usaha peningkatan kesejahteraan dan kemakmuran masyarakat (Murtidjo, 2001).

Pengembangan budidaya perairan merupakan alternatif yang cukup memberikan harapan. Dan memberikan kesempatan bagi budidaya perairan untuk menyediakan makanan yang berasal dari sumberdaya perairan. Selain itu, budidaya perairan juga berperan penting untuk kontribusi perekonomian. Ikan sebagai salah satu hasil dari perairan merupakan sumber pangan yang mengandung protein sebesar 15-20 %, kaya vitamin dan mineral tertentu, mengandung kolesterol rendah serta mempunyai nilai cerna sebesar 90-100 % (Liao, 2000).

Permintaan yang semakin meningkat tersebut diperlukan usaha untuk mempercepat proses pertumbuhan. Proses pertumbuhan dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sangat penting dan diperlukan dalam pengembangan teknologi dalam upaya mempercepat pertumbuhan ikan yang dibudidayakan. Bila ikan yang dibudidayakan memiliki pertumbuhan yang cepat, maka dapat dipastikan biaya yang dikeluarkan untuk proses produksi dapat dikurangi sehingga dapat memberikan hasil yang lebih besar (Fujaya, 2004).

Teknologi transgenik pada hewan merupakan salah satu teknologi yang menarik untuk dikembangkan (Chan *et al.*, 1999). Dan dengan metode elektroporasi, sperma yang dielektroporasi menunjukkan mempertinggi keberhasilan transfer gen

pada *common carp*, *African catfish* dan *tilapia* (Muller *et al.*, 1992). Sehingga diharapkan dengan transfer gen melalui metode elektroporasi merupakan terobosan baru dalam pengembangan teknologi budidaya perikanan.

1.2 Perumusan masalah

Beberapa teknik yang umum digunakan untuk memproduksi ikan transgenik, antara lain mikroinjeksi, elektroporasi, biolistik dan lipofeksi (Sucipto, 2008). Sedangkan metode yang dikemukakan Gardon (1994), antara lain: menggunakan sperma sebagai media transfer gen, mikroinjeksi pada pronukleus, dengan menggunakan *particle gun* (*Particle bombardment*, media virus, injeksi pada *germinal vesicle*, injeksi pada sitoplasma oosit).

Menurut Samarfilk (2002), diantara metode-metode yang lain, elektroporasi mempunyai kelebihan untuk transfer gen pada ikan karena lebih mudah dan lebih menghemat waktu. Teknik ini juga menggunakan listrik dengan voltase tertentu yang kemudian dialirkan selama beberapa saat. Harapannya adalah bahwa kopi DNA tersebut dapat melalui dinding sel yang memiliki permeabilitas tinggi (Sucipto, 2008). Elektroporasi bisa diaplikasikan hampir pada seluruh sel (Nickoloff, 1995).

Gagne *et al.* (1991), menyatakan dengan metode elektroporasi menunjukkan DNA asing dapat stabil di dalam sperma dan lebih menguntungkan karena dapat mengurangi kerusakan akibat mikro injeksi. Selain itu, menurut Kang *et al.*, (1999), mikroinjeksi dipandang sebagai metode yang membosankan dan memakan waktu lama serta tidak praktis untuk produksi masal dari generasi tunggal. Penggunaan sperma sebelum fertilisasi mempunyai keuntungan lain dibandingkan metode transgenik lainnya (Kurita *et al.*, 2009). Sperma sebagai media transfer gen sangat potensial dikembangkan dalam transgenik ikan karena prosedurnya yang relatif alami dan efisien (Sin *et al.*, 2008). Spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang

untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit. Metode sperma sebagai media transfer gen ditemukan oleh Brackett (Gandolfi *et al.*, 1989).

Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen ke dalam telur ikan zebra (Khoo *et al.*, 1992). Sperma sebagai media transfer gen yang dapat dikembangkan sebagai salah satu teknik transfer gen yang menguntungkan karena prosedurnya alamiah, spermatozoa dapat mengikat DNA dan terbawa sampai ke telur (Samarfilik, 2002). Pori membran dapat membuka sementara oleh penaikan perbedaan potensial membran yang disebabkan oleh pengaplikasian tegangan listrik (Golzio *et al.*, 1998). Adapun menurut Chen *et al.*, (2005), faktor yang mempengaruhi efisiensi elektroporasi adalah tegangan listrik, frekuensi kejutan dan lamanya kejutan serta suhu.

Menurut Weaver (1995), apabila tegangan yang diberikan terhadap sperma terlalu berlebihan, maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup kembali 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.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui pengaruh tegangan listrik (40 V), dengan lama kejutan dan frekuensi yang berbeda terhadap pergerakan (motilitas) dan kemampuan hidup (viabilitas) sperma ikan mas.
- Untuk mengetahui lama kejutan serta frekuensi yang optimal pada tegangan listrik 40 V terhadap pergerakan (motilitas) dan kemampuan hidup (viabilitas) sperma ikan mas.
- Untuk mengetahui kemampuan sperma yang telah diberi perlakuan dalam membuahi telur (daya fertilitas).

1.4 Kegunaan Penelitian

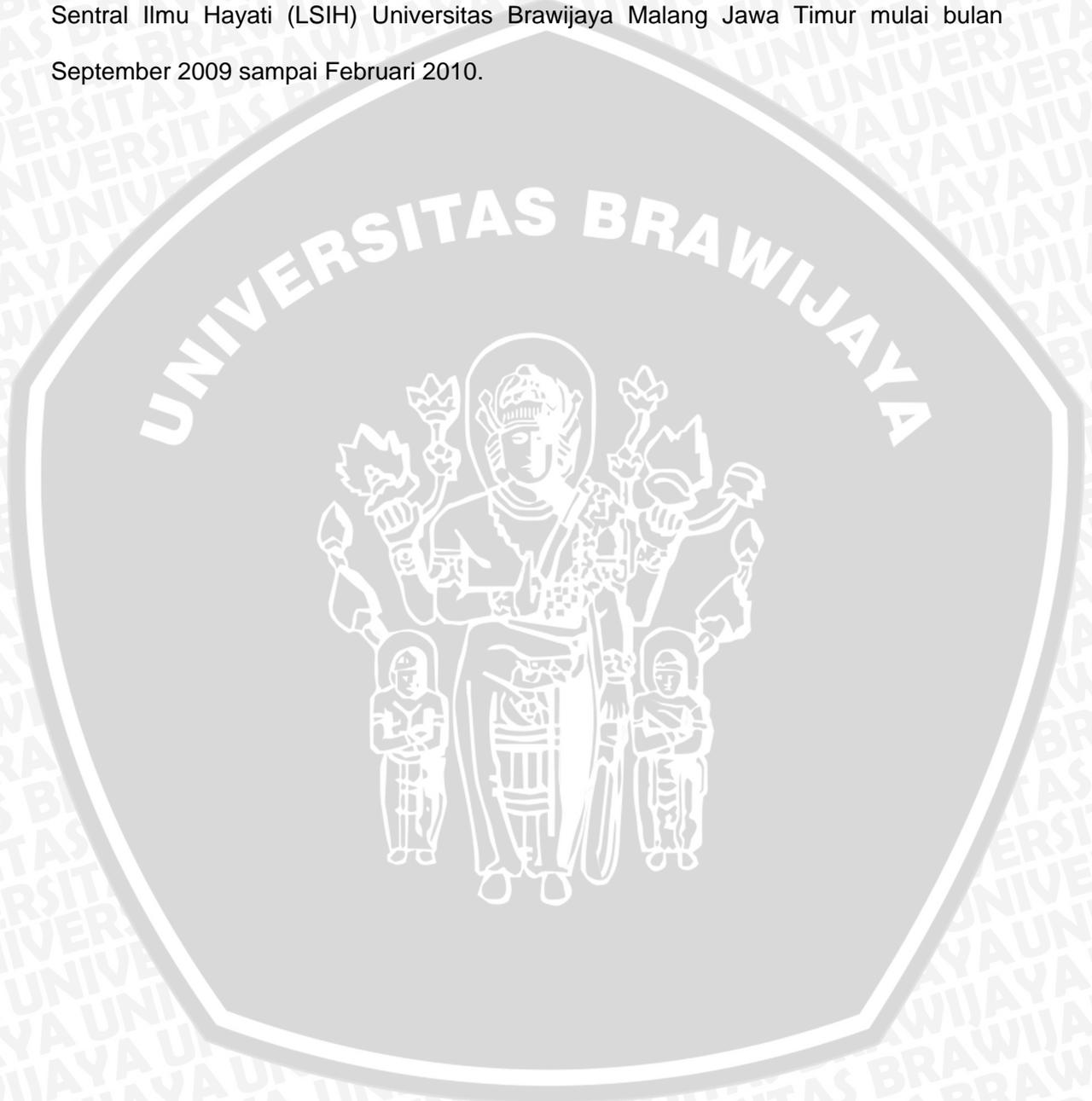
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan dapat dijadikan sumber informasi mengenai pengaruh pemberian tegangan listrik dengan lama kejutan dan frekuensi yang berbeda terhadap motilitas, viabilitas dan fertilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio*).

1.5 Hipotesis

- Ho :
- Diduga pemberian tegangan listrik dengan lama kejutan berbeda tidak berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan daya fertilitas spermatozoa ikan mas.
 - Diduga pemberian tegangan listrik dengan frekuensi berbeda tidak berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan daya fertilitas spermatozoa ikan mas.
 - Diduga pemberian tegangan listrik dengan interaksi lama kejutan dan frekuensi yang berbeda tidak berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan daya fertilitas spermatozoa ikan mas.
- H1 :
- Diduga pemberian tegangan listrik dengan lama kejutan berbeda berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan daya fertilitas spermatozoa ikan mas.
 - Diduga pemberian tegangan listrik dengan frekuensi berbeda berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan daya fertilitas spermatozoa ikan mas.
 - Diduga pemberian tegangan listrik dengan interaksi lama kejutan dan frekuensi yang berbeda berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan daya fertilitas spermatozoa ikan mas.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi dan Reproduksi ikan (laboratorium Breeding) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang Jawa Timur mulai bulan September 2009 sampai Februari 2010.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi ikan Mas (*Cyprinus carpio L*)

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi ikan mas menurut Saanin (1984), adalah sebagai berikut :

Philum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Sub kelas	: Teleostei
Ordo	: Ostariophisy
Subordo	: Cyprinoidea
Famili	: Cyprinidae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Species	: <i>Cyprinus carpio Linn</i>

2.1.2 Morfologi

Menurut Murtidjo (2001), ikan karper merupakan ikan air tawar yang paling populer dibudidayakan. Ikan karper memiliki badan memanjang agak pipih, lipatan mulut dan bibir halus, dua pasang kumis dan ukuran serta warna tubuhnya sangat beragam. Sedangkan menurut Hardjamulia (1979), morfologi secara umum adalah : badan memanjang agak pipih, ke samping (*compresed*), mulut disembulkan dan terletak di ujung (*terminal*), sungut ada dua pasang, sirip punggung lemah mengeras, letak permulaan sirip punggung tepat di atas permulaan sirip perut. Jari-jari sirip dubur pertama bergerigi. Sisik besar dan garis sisik rusuk (*Linea lateralis*) lengkap dan berada sampai pertengahan ujung batang ekor. Gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) terdiri dari tiga baris yang berbentuk molar. Ikan mas memiliki rumus sirip sebagai berikut D.III. 17-22; A3.5; P.1-5; V. I. 7-9 dan memiliki jumlah sisik pada linea lateralis sebanyak 35-39.



Gambar 1. Ikan mas

Selain warna tubuh, dari bentuk tubuh, sirip dan sirip ada beberapa varietas menurut Murtidjo (2001), yaitu :

- a. Kancadromas, yaitu ikan karper yang memiliki tubuh panjang, berwarna coklat keemasan atau kemerah-merahan, di tengah tubuhnya terdapat garis membujur yang merupakan batas warna antara bagian punggung lebih gelap dan bagian perut yang mengkilat keemasan, sisiknya relatif lebih kecil dan kurang teratur.
- b. Sinyonya, yakni ikan karper yang memiliki tubuh relatif panjang berwarna kuning muda, mata sipit sampai hampir tertutup dan berselaput kulit.
- c. Kumpay, yakni ikan karper yang memiliki sirip yang sangat panjang.
- d. Kaca, yakni ikan karper yang memiliki bentuk tubuh sedang, sisik tidak teratur dan beberapa bagian tubuh tidak tertutup sisik dan hanya sedikit yang tertutup sisik besar-besar.
- e. Punten, yakni ikan karper yang memiliki punggung tinggi dan tebal, warnanya hijau dan kepala relatif kecil.

2.1.3 Habitat dan kebiasaan hidup

Daerah yang cocok untuk budidaya ikan karper adalah daerah yang memiliki ketinggian 150-600 m di atas permukaan laut, dengan perairan yang memiliki

derajat keasaman (pH) antara 7-8 dan temperatur optimal adalah 20-25° C (Murtidjo, 2001). Ikan mas pemakan organisme hewan kecil renik ataupun tumbuh-tumbuhan (*omnivor*). Di kolam ketika tersedia hanya makanan alami, ikan-ikan muda terutama makan protozoa dan zooplankton seperti *copepoda*, *cladosera* dan zooplankton berukuran besar lainnya. Setelah mencapai ukuran 10 cm, ia memakan hewan-hewan dasar. Ikan ini mengaduk lumpur, memangsa larva-larva insekta, cacing-cacingan, moluska dan lain-lain. Organisme yang sangat disukai adalah larva chironomous (Rustidja, 1996)

2.1.4 Daerah Penyebaran

Spesies ikan mas (*Cyprinus carpio Linn*) masuk dalam genus *ciprinidae*. Di beberapa tempat ikan mas ini disebut ikan tombro, raya atau ameh. Ikan ini menurut sejarahnya berasal dari Cina dan Rusia, yang kemudian disebarkan di daerah Eropa dan negara-negara Asia Timur dan Selatan. Dan pada abad pertengahan merata di seluruh dunia, baik sebagai ikan kultur atau sebagai ikan liar (Susanto, 1987).

Penyebaran ikan mas dari daerah Asia, Eropa, Rusia, China, India, dan Asia Tenggara. Ikan ini bisa menyebar dari satu daerah ke daerah lainnya karena perdagangan. Budidaya ikan mas di kolam maupun penangkapan di alam telah berkontribusi dalam penyebarannya. Dan karena adanya populasi ikan mas liar di sungai Danube Eropa, ikan ini diperkirakan berasal dari Eropa dan spesies ini sekarang berada dalam pengawasan (Anonymous, 2009)

2.2 Ciri-ciri induk ikan mas yang matang gonad

Menurut Murtidjo (2001), ikan karper berusia 1-2 tahun atau setelah induk mencapai berat tubuh 1,5-2 kg sudah dapat dipijahkan. Hal ini dapat dilakukan jika induk karper tersebut sudah terlihat membesar, berenang dengan pergerakan yang

lamban, lubang anus terlihat agak membuka dan warnanya memerah dan jika perutnya diraba terasa lunak.

Induk ikan mas mempunyai karakter morfologis dengan kriteria sebagai berikut: bentuk tubuh kekar, pangkal ekor kuat dan lebar, sisik besar dan teratur, warna cerah, kepala lancip dan lebih kecil dari lebar tubuh (1 : 1,5), daerah perut melebar dan datar, badan tebal, dan berpunggung tinggi (Khairuman, 2008)

Ciri-ciri induk ikan karper yang baik dari segi bentuk luarnya menurut Murtidjo (2001), adalah sebagai berikut :

- a. Memiliki kepala relatif kecil dibandingkan dengan bentuk tubuhnya dan bentuknya agak meruncing.
- b. Memiliki tubuh tebal dan punggung tinggi
- c. Memiliki sisik teratur dan rapi
- d. Memiliki batang ekor lebar dan sirip ekor terbuka
- e. Memiliki sirip dada mulus

2.2.1 Induk jantan

Ikan mas jantan mencapai dewasa kelamin mulai umur 8 bulan. Ikan mas jantan yang siap dipijahkan akan terlihat keluarnya cairan putih jika perutnya diurut ke arah anus. Selanjutnya pemijahan berikutnya dapat dipijahkan 1-2 bulan lagi (Murtidjo, 2001).

Ciri induk jantan matang kelamin adalah bila dipijit atau diurut daerah urogenitalianya maka akan keluar sperma yang berupa cairan sperma yang berupa cairan putih

2.2.2 Induk betina

Menurut Rustidja (1995), induk betina mencapai kematangan gonad (TKG) I pada umur 1-2 tahun dengan berat badan minimal 1 kg. Kematangan gonad berikutnya selang 1,2-3 bulan. Sedangkan menurut Sudenda *et al* ., (2005), induk

betina yang mengalami matang telur antara lain bagian perutnya tampak gendut dan jika dilihat dari atas tampak menggelambir. Apabila diraba, perut terasa lembek dan di sekitar lubang urogenitalia tampak memerah serta apabila dipijit akan keluar telurnya.

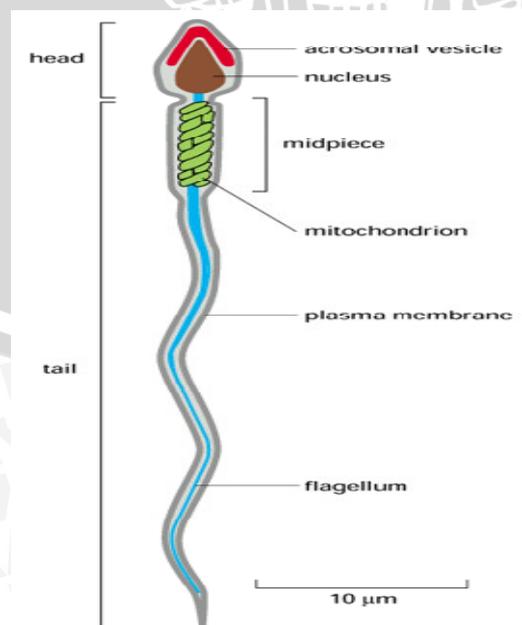
2.3 Spermatozoa

Cairan spermatozoa adalah cairan seminal yang dihasilkan dari dehidrasi testis (Harvey dan Hoar, 1979). Soeparna (1980), mengemukakan bahwa 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.

Cairan sperma adalah larutan spermatozoa yang berada dalam cairan seminal dan dihasilkan oleh hidrasi testis. Campuran antara seminal plasma dengan spermatozoa disebut semen. Dalam setiap testis semen terdapat jutaan spermatozoa. Sperma ikan yang sudah matang terdiri dari kepala, leher dan ekor. Ada sperma yang mempunyai "*middle piece*" sebagai penghubung antara leher dan ekor. Di dalam *middle piece* ini berisi mitokondria yang akan berfungsi untuk metabolisme sperma, potassium, sodium, kalsium, magnesium, posfat, klarida. Kepala sperma berisi materi inti, kromosom terdiri dari DNA yang bersenyawa dengan protein. Informasi genetika yang dibawa oleh spermatozoa diterjemahkan dan disimpan di dalam molekul DNA. Sperma yang didalamnya terkandung kromosom-X akan menghasilkan embrio betina sedangkan sperma mengandung kromosom-Y akan menghasilkan embrio jantan. Ekor sperma berfungsi memberi gerak maju seperti gerak cambuk. Selubung mitokondria berasal dari pangkal kepala membentuk dua struktur spiral ke arah berlawanan dengan arah jarum jam. Bagian tengah ekor merupakan gudang energi untuk kehidupan dan pergerakan spermatozoa oleh proses-proses metabolik yang berlangsung di dalam helix mitokondria. Mitokondria mengandung enzim-enzim yang berhubungan dengan

metabolisme spermatozoa. Bagian ini banyak mengandung fosfolipid, lesithin dan plasmalogen. Plasmalogen mengandung satu aldehyd lemak dan satu asam lemak yang berhubungan dengan gliserol maupun kolin. Asam lemak dapat dioksidasi dan sebagai sumber energi untuk aktivitas sperma. Komposisi kimiawi sperma pada plasma inti (*nukleoplasma*) di antaranya DNA, Protamine, Non-Basik Protein. Sedangkan seminal plasma mengandung protein. Komposisi kimia ekor sperma adalah protein, lesithin dan kolesterol. Sperma tidak bergerak dalam semen atau air mani, tetapi akan segera bergerak ketika bersentuhan dengan air. Fruktosa dan galaktosa merupakan sumber energi utama bagi sperma ikan mas (Gusrina, 2008). Haurbruge *et.al.*, (2000), mengatakan bahwa ikan *carp* dan *catfish* mempunyai biokimia spermatozoa dan proses spermatogenesis yang berbeda yaitu pada semen *carp* dapat dengan mudah distripping.

Spermatozoa terdiri dari dua bagian, yaitu kepala dan ekor. Tetapi ada pula spermatozoa yang memiliki tiga bagian, yaitu kepala, ekor dan tengah. Menurut Toelihere (1981), walaupun ukuran dan bentuk spermatozoa berbeda pada berbagai jenis hewan namun struktur morfologinya sama, yaitu terdiri dari kepala, bagian tengah dan ekor. Anatomi sperma menurut Alberts (2010), tertera pada Gambar 2.

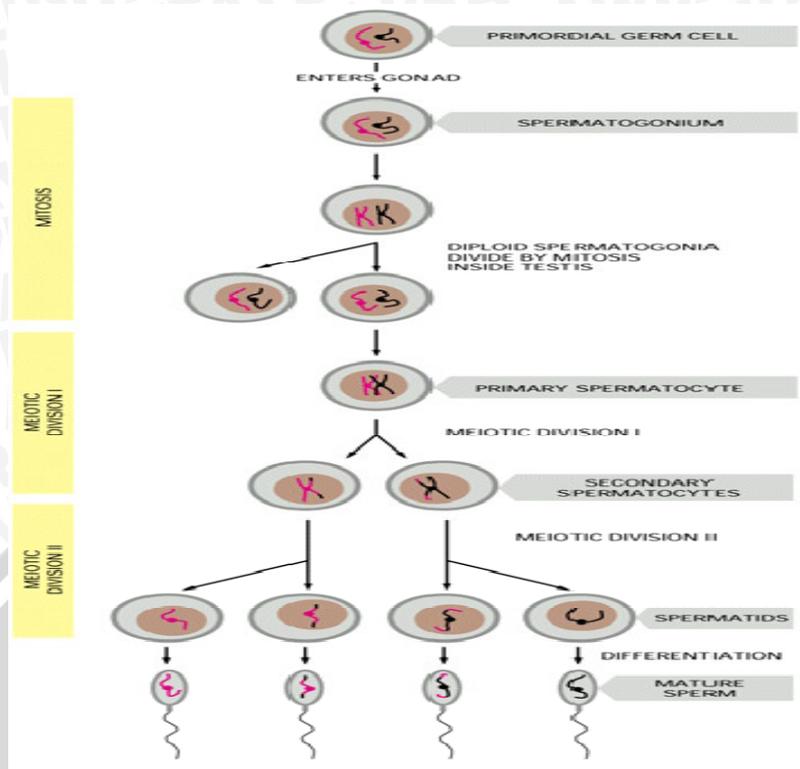


Gambar 2. Anatomi sperma (Alberts., 2010)

Komponen terluar dari sperma adalah membran plasma yang menutupi bagian-bagian sperma yang berbeda struktur dan fungsinya. Membran plasma pada sperma terdiri dari lapisan lemak dan protein (Amann *et al.*, 1992). Bagian kepala sperma dapat dibagi menjadi anterior akrosom dan post posterior akrosom. Bagan akrosom sperma terdapat nukleus, yang bagian luar dan dalamnya dikelilingi membran plasma (Oko *et al.*, 1989). *Middle piece* merupakan bagian dari ekor, yang terletak antara leher dan annulus (Nikolettos, 1999).

2.3.1 Proses Spermatogenesis

Perkembangan gamet jantan dari spermatogonium menjadi spermatozoa melalui dua tahap, yakni spermatogenesis dan spermiogenesis. Spermatogenesis adalah tahap perkembangan spermatogonium menjadi spermatid, sedangkan spermiogenesis adalah metamorfosa spermatid menjadi spermatozoa. Awal spermatogenesis ditandai dengan berkembangbiaknya spermatogonia beberapa kali melalui pembelahan mitosis, untuk memasuki tahap spermatosit primer. 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) (Fujaya, 2004). Proses spermatogenesis menurut Alberts (2010) tertera pada Gambar 3.



Gambar 3. Proses spermatogenesis (Alberts, 2010)

2.3.2 Pengambilan Sperma ikan mas

Menurut Rustidja (2000), induk ikan jantan yang matang gonad diambil dari bak induk secara hati-hati, kemudian dibungkus dengan lap halus pada bagian punggung, dipegang secara terlentang dengan lubang genital menghadap ke atas. Sperma dikeluarkan dengan cara memberikan tekanan halus pada bagian perut ikan, yaitu dimulai dari bawah linea lateralis (di atas sirip perut) ke arah lubang genital. Sperma yang dikeluarkan dihisap dengan spuit plastik 5 ml.

Stripping adalah proses dikeluarkannya telur atau sperma bukan secara alamiah. Proses pengeluaran sperma tersebut tentu saja menghendaki cara tertentu agar sperma tidak rusak ataupun justru induk ikan yang akan rusak atau mati. Seseorang yang akan melakukan stripping telur atau sperma ikan harus tahu cara stripping yang baik dan tahu posisi gonad ikan. Gonad ikan terletak di bagian atas rongga tubuh, memanjang pada vertebrae rongga tubuh hingga berakhir pada lubang genital dengan demikian arah urutan/stripping akan benar atau organ yang

diurut tidak salah. Sperma tidak akan bisa distripping jika proses fisiologis ovulasi belum sempurna (Gusrina, 2008).

2.3.3 Buffer sperma

Effendy (1997), menyatakan bahwa kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis hanya berkisar antara 1-2 menit sedangkan menurut Rustidja (1999), 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). Menurut Rustidja (1985), penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit.

2.3.4 Konsentrasi spermatozoa

Menurut Billiard *et al.* (1996), konsentrasi sperma adalah salah satu parameter utama dalam evaluasi kualitas sperma. Sedangkan menurut Toelihere (1981), penilaian konsentrasi sperma (juta sel/ml) sangat penting karena faktor inilah yang menggambarkan sifat-sifat semen dan dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas sperma.

Semakin tinggi konsentrasi sperma maka kemungkinan terjadinya fertilisasi akan semakin besar pula. Untuk ikan yang mampu menghasilkan telur sampai ratusan ribu butir selain dibutuhkan konsentrasi yang tinggi juga membutuhkan volume sperma yang lebih banyak pula (Rustidja, 2000).

Banyaknya sperma yang dapat dikeluarkan dari satu ekor jantan bergantung kepada umur, ukuran dan frekuensi pengeluaran sperma (Kazakov, 1981). Konsentrasi sperma ikan mas dalam setiap cm kubik bisa mencapai 10-20 milyar (Woynarovich dan Horvath, 1980).

2.3.5 Kandungan Sperma ikan mas

Kruger *et al.*, (1979), menyatakan bahwa cairan spermatozoa ikan mas adalah keputih-putihan dengan kekentalan yang tinggi, mengandung glukosa 5,70 mg/100ml, pH 7,53. Sedangkan menurut Billard (1978), ion utama dalam cairan seminal adalah K^+ dan Na^+ .

Plasma semen memiliki pH sekitar 7.0 dan tekanan osmotik sama dengan darah, yaitu ekuivalen dengan 0,9 % *sodium chloride*. Secara biokimiawi sperma mengandung persenyawaan-persenyawaan organik spesifik seperti fruktosa, asam sitrat, sorbitol, inositol, *glycerilphosphorylcholine* (GPC), *ergothionine* dan prostaglandin. Persenyawaan-persenyawaan ini dihasilkan oleh berbagai kelenjar pelengkap atas pengaruh testoteron dan testes (Toelihere, 1985).

Menurut Ploudy dan Bilard (1983), komposisi cairan seminal plasma ikan mas mengandung antara lain : air 98,5 %, bahan organik 58% (dari total berat kering), Na 1,8 gr/l, Ca 28,5 mg/l, P 33 ± 20 mg/l, *phospolipid* $5,6 \pm 1$ mg/l, total protein $1,2 \pm 0,3$ g/l dan asam amino $36,7 \mu\text{M/ml}$ serta pH $7,96 \pm 0,3$.

Menurut Billard (1978), komposisi organik milt (seminal plasma) dari catfish dan carp mempunyai energi substrat seperti glukosa dan fruktosa, laktase, piruvat, malat dan bahan yang lainnya dalam jumlah yang kecil pada spermatozoa. Berdasarkan tipe spermatozoa tersebut menyebabkan adanya beberapa perbedaan susunan kimia yang terkandung didalamnya.

Menurut Marawali (2001), fruktosa adalah substrat energi utama di dalam plasma semen yang telah diproduksi kelenjar vesikularis. Selain itu fruktosa merupakan turunan karbohidrat yang dapat dijadikan sumber energi untuk mendukung pergerakan (motilitas) dan ketahanan spermatozoa (Teolihere, 1981). Partodihardjo (1987), menyatakan bahwa cairan sperma yang baik derajat kekentalannya hampir sama atau sedikit lebih kental dari susu.

2.3.6 Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa

a. Pergerakan sperma

Ekor spermatozoa merupakan bagian yang berfungsi sebagai alat gerak, karena dilengkapi suatu tempat yang dapat memberi tenaga bagi spermatozoa dan fibril-fibril halus yang merupakan bagian motoris (Ginzburg, 1972; Soeparna, 1980). Pergerakan spermatozoa dapat dipakai sebagai indikator kualitas spermatozoa, walaupun belum dapat menjamin terjadinya pembuahan yang berhasil (Harvey dan Hoar, 1979).

Spermatozoa bersifat immotil dalam cairan plasmanya dan akan bergerak apabila bercampur dengan air. Pergerakan spermatozoa jarang berupa garis lurus, biasanya berbentuk spiral. Gerak progresif secara berkesinambungan hanya terjadi 1 menit setelah bersentuhan dengan air dan hanya 50% yang masih dapat berenang setelah 3 menit. Sebagian spermatozoa air tawar dapat motil tidak lebih dari 2-3 menit setelah bersentuhan dengan air. Sedangkan sperma ikan air laut dapat motil lebih lama bahkan ada yang lebih dari 60 menit (Fujaya, 2004).

Adapun kecepatan serta lamanya sperma bergerak bergantung kepada berbagai faktor, antara lain jenis serta konsentrasi unsur yang terkandung di dalamnya, suhu, pH dan metabolisme sel serta konsentrasi spermatozoa dalam cairan sperma (Scot dan Baynes, 1980). Pergerakan sperma dipengaruhi pula oleh salinitas air. Umumnya pergerakan sperma ikan yang memijah dalam air laut lebih lama dibandingkan dengan dalam air tawar. Hal ini disebabkan karena air laut lebih banyak mengandung zat-zat yang terdapat dalam sperma (Harvey dan Hoar, 1979). Sedangkan menurut Fujaya (2004), lamanya spermatozoa motil dipengaruhi oleh umur dan kematangan spermatozoa, temperatur dan faktor-faktor lingkungan lain seperti ion-ion, pH dan osmolalitas. Sedangkan kecepatan Bergeraknya tergantung spesies. Diantara ikan-ikan yang telah diamati pergerakannya didapatkan bahwa kecepatan pergerakan maksimum didapatkan pada sperma *trout* dan *white fish* yaitu 160-330 μ s /detik.

Persentase sperma yang motil progresif sering dijadikan acuan penilaian kualitas spermatozoa dan indikasi fertilitasnya (Moghadam *et al.*, 2005). Semen yang normal menunjukkan 60% spermatozoa motil (Moeloek, 2008). Effendy (1997), menyatakan bahwa kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis hanya berkisar antara 1-2 menit.

Menurut Soeparna (1980), pergerakan spermatozoa memerlukan energi seperti halnya pada sel-sel hidup lainnya. Selanjutnya dikatakan Arie (2008), bahwa dalam penyimpanan sperma, motilitas spermatozoa adalah parameter yang berguna untuk memperkirakan kelangsungan hidup spermatozoa.

b. Kemampuan hidup spermatozoa

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

Menurut Lagler *et al.*, (1972), ketahanan hidup sperma dipengaruhi oleh temperatur dan pada umumnya dapat hidup lebih lama pada temperatur rendah.

Sperma yang telah diawetbekukan masih dapat digunakan untuk fertilisasi, setelah proses pembekuan (*thawing*) dengan jumlah 50% atau lebih sperma hidup, selain itu juga proses pengawet bekuan, tidak merusak fertilitas dari sperma (Fairfax, 2008). Pada pembuahan sperma yang telah disimpan, pencampuran sperma dan telur harus dilakukan segera karena ketahanan hidup sperma yang didinginkan berkurang dengan cepat pada suhu kamar (Hoar *et al.*, 1983 dan Kurokura *et al.*, 1984).

Menurut Soehartojo (1995), di luar testis sel spermatozoa mampu memakai sumber energi dari luar untuk melanjutkan hidupnya. Menurut Partodihardjo (1987),

penentuan kelangsungan hidup spermatozoa berdasarkan atas prinsip-prinsip sebagai berikut :

- a. Sperma yang hidup adalah sperma yang bergerak cepat, lambat atau sedikit pergerakannya pada kepala atau ekor.
- b. Sperma yang mati adalah sperma yang tidak memperlihatkan pergerakan-pergerakan sama sekali pada bagian kepala maupun ekor.

c. Daya fertilitas spermatozoa

Fertilisasi adalah pembuahan, pertemuan dan bersatunya sel kelamin jantan (sperma) dengan sel kelamin betina (sel telur) (Kartasudjana, 2001). Menurut Stoss dan Donalson (1982), di dalam testis dan seminal plasma, spermatozoa bersifat immotil sehingga tidak mampu untuk melakukan fertilisasi.

Menurut Soehartojo (1995), di luar testis sel spermatozoa mampu memakai sumber energi dari luar untuk melanjutkan hidupnya. Ketika sel telur membiarkan satu masuk, sperma lain tidak mungkin masuk. Penyebabnya adalah medan listrik yang terbentuk di sekeliling sel telur. Wilayah di sekeliling telur bermuatan negatif (-) dan begitu sperma pertama menembus sel telur, muatan ini berubah menjadi positif (+). Oleh karena itu, sel telur tersebut, yang kini bermuatan sama dengan spermatozoa lain di luar, mulai menolak mereka (Yahya, 2002).

Harvey dan Hoar (1979), menyatakan bahwa kemampuan membuahi sperma tidak hanya dipengaruhi motilitasnya saja, tetapi sperma yang sudah mulai berkurang motilitasnya hanya mempunyai waktu singkat untuk membuahi. Sedangkan Hoar *et al* ., (1983), menyatakan bahwa lama motilitas dan daya fertilitas sperma tiap jenis ikan berbeda-beda, tetapi pada umumnya motilitas dan kemampuan sperma untuk membuahi adalah sejalan.

2.4 Hubungan Viabilitas dan Motilitas

Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa akan berbanding terbalik, yaitu semakin meningkatnya waktu motilitas spermatozoa maka akan menurun waktu viabilitasnya (Hidayaturrohmah, 2007).

Energi yang dihasilkan oleh serabut ekor yang berasal dari uraian Adenosine Trifosfat (ATP) dan Adenosine difosfat (ADP) langsung dipakai untuk pergerakan spermatozoa, dimana energi yang dipakai pada proses tersebut banyak didapatkan adanya ikatan fosfat (P_P). Jika pasediaan P_P dalam ATP dan ADP telah habis, maka kontraksi fibril spermatozoa berhenti dan gerakan spermatozoa berhenti, sehingga untuk menjaga motilitas ATP dan ADP harus dibangun kembali dan untuk membangun kembali ATP dan ADP diperlukan sumber energi dari luar. Kebanyakan aktivitas faal disertai dengan pelepasan energi uraian dari bahan organik seperti karbohidrat dan lemak. Pembentukan kembali ATP dapat terjadi tanpa oksigen, bila disertai glikolisis dan respirasi. proses glikolisis ini mendukung daya hidup spermatozoa dalam keadaan aerob pada penyimpanan semen untuk inseminasi buatan. Metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerob menghasilkan laktat yang semakin lama akan semakin tertimbun dan mempertinggi derajat keasaman atau menurunkan pH larutan sehingga diperlukan bahan penyangga (*buffer*) untuk mempertahankan pH sperma (Hafez, 2000).

2.5 Metode Elektroporasi

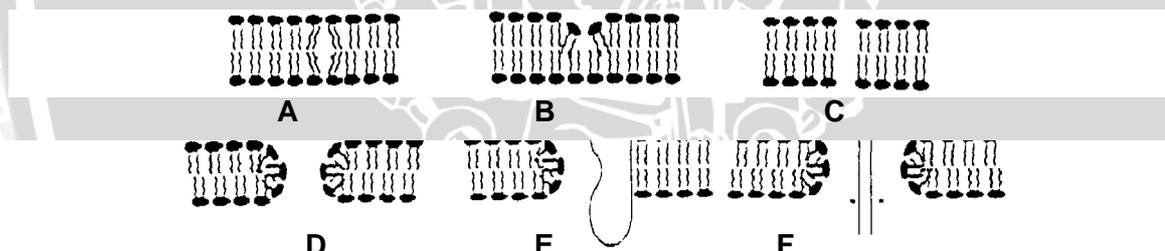
Elektroporasi merupakan sebuah metode untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel bakteri, khamir, tanaman dan binatang (Neumann *et al.*, 1982; Potter *et al.*, 1984; Shigekawa and Dower, 1988). Metode ini telah populer untuk memasukkan gen asing ke embrio atau sperma organisme air sejak beberapa tahun (Powers *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1996; Sin *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2005). Menurut Purves *et al.*, (2001), Elektroporasi merupakan metode mekanik yang digunakan untuk memasukkan molekul ke dalam sel inang melalui membran

sel. Dalam prosedur ini, suatu kejutan listrik yang besar digunakan untuk membuka sementara lapisan fosfolipid, yang menyebabkan molekul asing seperti DNA menjadi bagian dalam sel.

Prinsip fisika yang penting dalam elektroporasi antara lain:

- Penggunaan kejutan listrik dengan besaran optimal dan lamanya kejutan dapat menginduksi sementara keadaan permeabilitas pada sel yang diberi kejutan listrik (Neumann *et al.*, 1982).
- Arus listrik dibutuhkan untuk mempertahankan kejutan listrik pada media yang mengandung listrik (Hayt, 1974).
- Panas yang dihasilkan dari arus listrik pada media yang mengandung ion sebanding dengan arus (Anonymous, 2009)

Aplikasi penggunaan kejutan listrik pada sel dan jaringan diketahui dapat menyebabkan beberapa tipe penyusunan ulang dari membran sel tersebut. menurut Weaver (1996), seperti yang tertera pada Gambar 4.

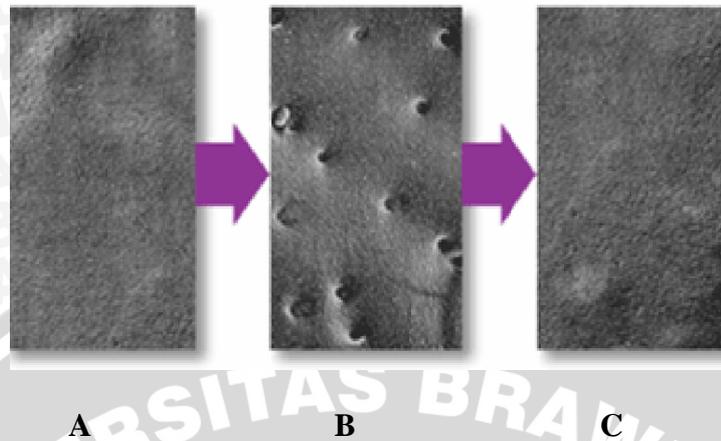


Gambar 4. Gambar ilustrasi proses terbukanya sementara membran dan penyusunan ulang selama elektroporasi (Weaver, 1996)

Keterangan gambar 4. :

- Keadaan membran yang masih stabil
- Permukaan membran menekuk ke dalam membran (berbentuk lesung)
- Pori-pori yang hidrofobik mulai membuka, baru setelah itu pori-pori hidrofilik
- Setelah pori-pori hidrofilik membuka, baru ion atau molekul bisa lewat
- Protein di pori-pori mulai bergabung
- Pori-pori menutup kembali dengan molekul asing yang sudah terperangkap di dalamnya.

Sedangkan proses membukanya membran selama elektroporasi tertera pada gambar 5.



Gambar 5. Proses membukanya membran selama elektroporasi

Keterangan :

A : membran sel sebelum dielektroporasi

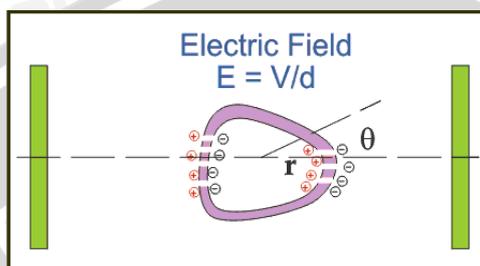
B : membran sel selama elektroporasi

C : Membran sel setelah elektroporasi (membran sel kembali seperti semula)

Gambar 5 menunjukkan elektroporasi dengan lama kejutan milidetik yang membuat pori-pori membran sel membuka sementara. Setelah jangka waktu yang sangat pendek, pori-pori membran menutup kembali, akan tetapi, bekas pori yang membuka tidaklah rusak. Selama waktu pori-pori membuka, biomolekul dapat dimasukkan dan terperangkap di dalam sel (Jim, 2008).

Pemberian tegangan listrik pada sebuah sel menyebabkan penyebaran kembali ion-ion bagian dalam, hal itu terjadi karena membran sel bertindak sebagai insulator. Ion-ion bergerak sesuai dengan arah medan listrik, akan tetapi tetap berada dalam sel sehingga terkumpul di daerah kutub searah dengan arah medan listrik. Berkumpulnya ion di daerah kutub dalam sel menciptakan potensi listrik pada membran sel. Ketika jaringan membran mendekati batas 1 volt perubahan penyesuaian akan terjadi di dalam membran sehingga mempengaruhi permeabilitas yang ada. Potensi listrik yang ada pada membran sel tidak selalu sama pada

seluruh permukaan. Potensi tersebut akan mencapai puncaknya ketika permukaan membran sel tegak lurus dengan medan listrik (berada dalam daerah medan listrik) dan terendah ketika permukaan membran sel berada dalam posisi paralel atau berada di garis singgung dengan medan listrik (tidak berada dalam area medan listrik). Potensi jaringan membran sel nilainya bervariasi dalam medan listrik, Gambar medan listrik saat elektroporasi seperti tertera pada Gambar 6.

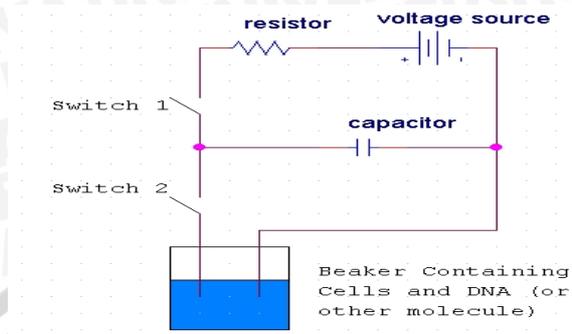


Gambar 6. Medan listrik saat elektroporasi

Peningkatan tegangan listrik dari salah satu kutub yang lebih besar dari kutub kutub lainnya akan mempengaruhi permeabilitas permukaan sel, Hal ini karena pengaruh kosinus pada rumus $E = V/d$. Kejutkan listrik yang pertama yang berpengaruh paling besar pada permeabilitasnya membran sel. Area permeabel pada membran sel menjadi tidak stabil. karena sisi anoda (+) lebih besar daripada katoda (-). Hal ini disebabkan karena sel mempunyai muatan negatif yang alami pada membrannya (Golzio *et al.*, 2002)

Tegangan yang diberikan membuka membran untuk sementara sehingga molekul asing bisa masuk ke dalam sel melalui kutub sel. Akan tetapi setelah itu membran menutup kembali dengan cepat dan sel tetap utuh seperti semula (Purves *et al.*, 2001). Setiap sel hewan dilapisi oleh membran plasma, yang mempunyai struktur lapisan lemak. Besarnya molekul yang ada pada membran plasma tidaklah sama. Karena tersusun oleh molekul lemak, membran plasma mempunyai sifat yang elektris atau dengan kata lain mempunyai permeabilitas asli yang rendah terhadap ion. Ketebalan membran diperkirakan sekitar 7-8 nanometer (Anonymous, 2009) : ~6 nm (Weaver, 1996) ; 6-7,5 (Giese, 1979). Potensial membran pada suatu sel diperoleh dari dua faktor, yaitu kekuatan elektris dan difusi. Kekuatan elektris

muncul dari daya tarik antar partikel yang berlawanan dengan perubahan listrik (positif dan negatif) dan daya tolak menolak antara partikel yang sejenis (keduanya positif atau keduanya negatif) tertera pada Gambar 7.



Gambar 7. Rangkaian dasar tegangan listrik yang digunakan untuk elektroporasi.

Tegangan listrik (kadang disebut sebagai voltase) adalah perbedaan potensial listrik antara dua titik dalam rangkaian listrik dan dinyatakan dalam satuan volt. Besaran ini mengukur energi potensial dari sebuah medan listrik yang mengakibatkan adanya aliran listrik dalam sebuah konduktor listrik. Tergantung pada perbedaan potensial listriknya, suatu tegangan listrik dapat dikatakan sebagai ekstra rendah, rendah, tinggi atau ekstra tinggi (Taghyr, 2008).

Dalam suatu bahan, jika ada pengaruh dari luar sehingga menyebabkan elektron-elektron bergerak ke satu arah, maka dikatakan terjadi arus listrik yang arahnya berlawanan dengan arah gerakan elektron-elektron tadi. Arus listrik didefinisikan sebagai kecepatan aliran muatan listrik. Arus sebesar 1 ampere adalah aliran muatan listrik sebanyak 1 coulomb/detik (Zhanggischan *et al.*, 2004)

2.6 Elektroporasi Sperma Sebagai Media Transfer Gen

Elektroporasi dengan perlakuan listrik voltase tinggi menyebabkan permeabilitas tinggi untuk sementara pada membran sel dengan membentuk pori-pori sehingga DNA mudah penetrasi ke dalam sel. Integritas membran kembali membaik seperti semula dalam beberapa detik sampai semenit setelah perlakuan listrik (Herman, 2009). Sel dapat membuka sementara oleh peningkatan membran yang diinduksi dengan tegangan listrik tinggi (Golzio *et al.*, 1998).

Sperma sebagai media transfer gen yang dapat dikembangkan sebagai salah satu teknik transfer gen yang menguntungkan karena prosedurnya alamiah dan spermatozoa dapat mengikat DNA dan membawa sampai ke telur. Prosedur sperma sebagai media transfer gen di mamalia masih sangat kontroversi pada saat ini, karena kemampuan hidup sperma setelah keluar dari tubuh waktunya relatif singkat (hanya beberapa menit). Pada sisi lain sperma ikan dapat disimpan, yang mana teknik ini menjadi harapan baru dalam teknik transfer gen (Samarfilk, 2002).

Menurut Samarfilk (2002), elektroporasi mempunyai kelebihan untuk transfer gen pada ikan karena lebih mudah dan lebih menghemat waktu. Gagne *et. al* (1991) dengan menggunakan elektroporasi menunjukkan DNA asing dapat stabil di dalam sperma dan lebih menguntungkan karena dapat mengurangi trauma akibat mikro injeksi. Selain itu, menurut Kang *et al.*, (1999), sperma sebagai media transfer gen mempunyai keunggulan antara lain lebih sederhana, ekonomis dan sebagai metode yang dapat dilakukan dalam jumlah yang banyak.

Penggunaan sperma yang dielektroporasi sebelum fertilisasi mempunyai keuntungan lain dibandingkan metode transgenik lainnya (Kurita, *et al* . 2009). Sperma sebagai media transfer gen sangat potensial dikembangkan dalam transgenik ikan karena prosedurnya yang relatif alami dan efisien (Sin *et al.*, 2008).

Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen ke dalam telur ikan zebra (Khoo *et al.*,1992). Sperma sebagai media transfer gen yang dapat dikembangkan sebagai salah satu teknik transfer gen yang menguntungkan karena prosedurnya alamiah, spermatozoa dapat mengikat DNA dan terbawa sampai ke telur (Samarfilk, 2002). Sperma yang dielektroporasi menunjukkan mempertinggi keberhasilan transfer gen pada *common carp*, *African catfish* dan *tilapia* (Muller *et al.*, 1992). Sel dapat membuka sementara oleh penaikan perbedaan potensial membran yang disebabkan oleh pengaplikasian tegangan listrik (Golzio *et al*, 1998). Sperma sebagai media transfer gen yang dapat dikembangkan sebagai salah satu teknik transfer gen yang menguntungkan karena prosedurnya alamiah,

spermatozoa dapat mengikat DNA dan terbawa sampai ke telur. Menurut Chen *et al.*, (2005), faktor yang mempengaruhi efisiensi elektroporasi adalah tegangan listrik, frekuensi kejutan dan lamanya kejutan serta suhu.

Menurut Symonds *et al.*, (1994), bahwa pengambilan DNA yang akan ditransfer tergantung pada tegangan listrik (kV/cm atau v/cm), frekuensi kejutan yang digunakan dan konsentrasi DNA. Sedangkan efisiensi transfer DNA ke embrio yang dielektroporasi sangat dipengaruhi oleh tegangan dan lama kejutan. Menurut Andree *et al.*, (2008), kejutan listrik pada jaringan otot memainkan dua peran, yaitu merubah struktur permeabilitas serabut otot dan membantu perpindahan DNA melewati permeabilitas membran. Perpindahan molekul DNA ke dalam sel, suatu transfer gen dari sel yang berisi DNA asing melalui kejutan listrik. Dua jenis kejutan listrik yang berbeda yaitu square wave dan eksponensial wave telah digunakan dalam mentransfer gen ke dalam sperma ikan. Tegangan *square wave* lebih diarahkan kepada amplitude yang diperlukan yang mana untuk menjaga lamanya waktu kejutan kemudian dikembalikan ke nol. Sedangkan *eksponensial wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitude yang diinginkan, kemudian memberikan pembukaan pori-pori yang eksponen (Muller *et al.*, 1992).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



III MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Larutan Na-fis sebagai pengencer sperma saat dielektroporasi
- Eosin sebagai pewarna sperma
- Induk jantan ikan mas (*Cyprinus carpio L*) yang akan distripping dan diambil cairan sperma
- Induk betina ikan mas (*Cyprinus carpio L*) yang akan distripping dan diambil teluranya
- Sperma ikan mas yang akan diamati viabilitas, motilitas dan daya fertilitasnya.
- Telur ikan mas yang diamati perkembangan teluranya
- Air aerasi untuk mengaktifkan sperma
- Ovaprim yang digunakan untuk penyuntikan induk ikan untuk mempercepat kematangan gonad
- HCL dan Ethanol untuk membersihkan cuvet
- Ijuk sebagai media untuk menempel sel telur ikan mas.
- Tissue untuk membersihkan alat-alat

3.1.2 Alat

Sedangkan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Satu set alat elektroporator (BIO-Rad) yang digunakan untuk memberi kejutan listrik pada sperma ikan mas (di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya)
- *Cuvette* sebagai tempat sperma saat dielektroporasi.

- Mikroskop DIC yang digunakan untuk mengamati motilitas sperma ikan mas (di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati)
- Mikroskop yang digunakan untuk mengamati perkembangan sel telur (di laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan)
- Kamera digital untuk mengambil gambar perkembangan sel telur.
- Bak pemeliharaan induk ikan mas sebagai media hidup induk ikan mas (di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya)
- *Objek glass* untuk mengamati motilitas, viabilitas dan mengamati perkembangan sel telur ikan mas.
- *Cover glass* untuk menutup objek glass saat mengamati motilitas dan untuk meratakan eosin saat pengawetan sperma.
- *Haemocytometer* untuk menghitung sel sperma
- *Hand tally counter* untuk menghitung sel sperma yang hidup, menghitung sel telur yang terfertilisasi dan menghitung daya tetas telur.
- Spuit sebagai tempat sperma saat stripping
- Mikro pipet untuk mengambil sel sperma, Na-Fisiologis dan aquadest (di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya)
- Timbangan digital AND EK 610 I yang digunakan untuk menimbang berat sel telur ikan mas (di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya)
- Timbangan digital METER PE 22 yang digunakan untuk menimbang berat induk ikan mas (di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya)
- Mangkok yang digunakan untuk tempat telur hasil striping

- Penggaris yang digunakan untuk mengukur panjang total ikan mas
- Bak fiber sebagai tempat induk ikan mas setelah disuntik ovaprim
- Cawan Petri sebagai tempat telur yang difertilisasikan
- Botol film sebagai tempat pengenceran
- Satu set alat inkubator sebagai media inkubasi telur yang sudah dibuahi sperma.
- Ependorf sebagai tempat sperma setelah elektroporasi

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 variabel-variabel yang diselidiki (Sahri, 1992).

Nazir (2003) menyatakan bahwa 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.

3.3 Rancangan penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap faktorial. Menurut (Gazperz, 1991) percobaan faktorial sebagai suatu percobaan mengenai sekumpulan perlakuan yang terdiri atas semua kombinasi yang mungkin dari taraf beberapa faktor.

Sekumpulan kombinasi perlakuan tersebut yang dinyatakan dengan kata factorial. Percobaan dengan faktorial digunakan jika faktor yang digunakan dalam

percobaan lebih dari satu. Rancangan ini memungkinkan kita melakukan kombinasi antar level faktor (Sa'diyah, 2009).

Model statistika untuk percobaan faktorial yang terdiri dari dua faktor (faktor A dan faktor B) dengan menggunakan rancangan dasar RAL menurut Gazperz (1991), adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijks} \quad ; i = 1, \dots, a$$

$$j = 1, \dots, b$$

$$k = 1, \dots, r$$

dimana :

Y_{ijk} = nilai pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-l dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B)

μ = nilai tengah populasi (rata-rata yang sesungguhnya)

α_i = pengaruh aditif taraf ke-l dari faktor A

β_j = pengaruh taraf ke-j dari faktor

$(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh interaksi taraf ke-l faktor A dan taraf ke-j faktor B

ε_{ijks} = pengaruh galat dari satuan percobaan ke- k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

Dalam penelitian ini, perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut :

Faktor perlakuan lama kejutan (A) yang terdiri dari 2 level, yaitu

- A1 = lama kejutan 0,5 ms (milidetik)
- A2 = lama kejutan 1,0 ms (milidetik)

Faktor perlakuan frekuensi kejutan (B) terdiri dari 3 level, yaitu

- B1 = frekuensi kejutan 2 kali
- B2 = frekuensi kejutan 4 kali
- B3 = frekuensi kejutan 6 kali

Sehingga didapatkan $2 \times 3 = 6$ perlakuan kombinasi, yaitu :

Perlakuan A1B1 : perlakuan pemberian kejutan listrik 40 V dengan lama kejutan 0,5 ms dan frekuensi kejutan 2 kali

Perlakuan A1B2 : perlakuan pemberian kejutan listrik 40 V dengan lama kejutan 0,5 ms dan frekuensi kejutan 4 kali

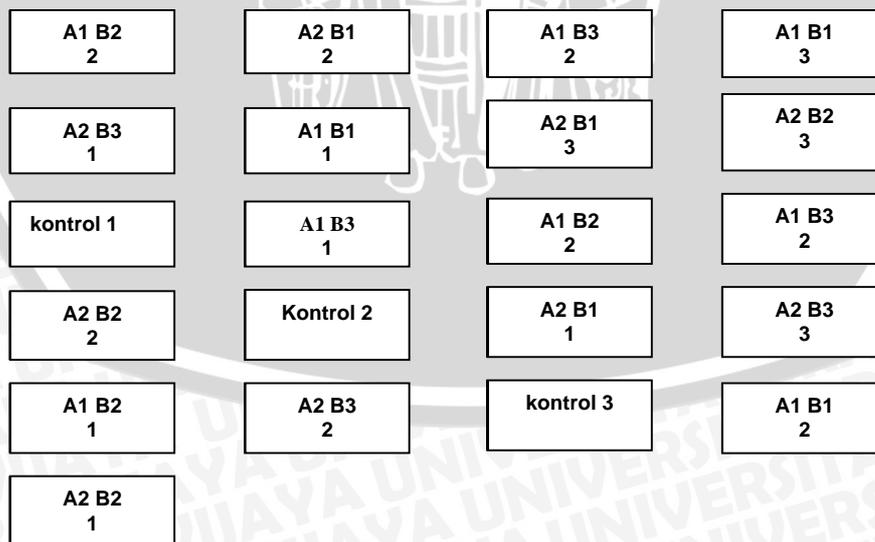
Perlakuan A1B3 : perlakuan pemberian kejutan listrik 40 V dengan lama kejutan 0,5 ms dan frekuensi kejutan 6 kali

Perlakuan A2B1 : perlakuan pemberian kejutan listrik 40 V dengan lama kejutan 1,0 ms dan frekuensi kejutan 2 kali

Perlakuan A2B2 : perlakuan pemberian kejutan listrik 40 V dengan lama kejutan 1,0 ms dan frekuensi kejutan 4 kali

Perlakuan A2B3 : perlakuan pemberian kejutan listrik 40 V dengan lama kejutan 1,0 ms dan frekuensi kejutan 6 kali

Serta satu perlakuan kontrol (K) yaitu sperma tanpa diberi kejutan listrik. dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Adapun denah / layout percobaan tertera pada gambar 8



Gambar 8. Denah percobaan

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Persiapan penelitian

Menyiapkan induk ikan mas jantan dan ikan mas betina yang sudah matang gonad untuk diambil sperma dan sel telurnya dengan cara stripping. Kemudian menyiapkan alat elektroporasi dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- Steker alat disambungkan ke sumber listrik
- Tombol power disamping kanan alat ditekan untuk menyalakan alat
- Tampilan awal muncul pada home screen
- Pada tampilan home screen dipilih nomor 3 “ square wave protocols “ dengan cara menekan tombol 4.
- Muncul tampilan protocol detail : square wave
 - Voltage xxx
 - Pulse length (ms) xxx
 - Number of pulse xxx
 - Cuvette (mm) xxx
- Tanda xxx diisi sesuai dengan perlakuan
- Tekan tombol enter pada keypad
- Persiapkan sampel dengan langkah sebagai berikut:
 - Dimasukkan 25 μ l sperma
 - Dibuka tutup shock pod
 - Dipasang cuvette pada shock pod
 - Ditutup kembali shock pod
- Tekan tombol pulse untuk menjalankan elektroporator
- Muncul hasil dengan tampilan sesuai dengan parameter yang dipilih

3.4.2 Pelaksanaan penelitian

Skema kerja kegiatan penelitian:

Ikan mas jantan yang sudah matang gonad

- Diukur panjangnya dengan menggunakan penggaris
- Ditimbang beratnya dengan menggunakan timbangan metler PE 22
- Distriping
- Ditampung dalam spuit

Sperma

- dipindah ke ependorf
- diambil dengan mikropipet diteteskan pada haemocytometer
- dihitung jumlahnya
- diamati pergerakannya (motilitas) di bawah mikroskop BX 51 DIC dan diamati viabilitasnya

Elektroporator

- Sperma diambil dengan mikropipet sebanyak 25 μ l
- Dimasukkan ke dalam cuvette
- Diberi kejutan listrik dengan metode elektroporator sesuai perlakuan
- Ditambah Nafisiologis 275 μ l
- Dimasukkakn ependorf
- Diulang sebanyak 3 kali

Sperma yang sudah diberi kejutan listrik

- 5- 10 μ l diamati motilitasnya di bawah mikroskop BX 51
- Dicatat hasilnya dan dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan
- 5- 10 μ l diamati viabilitasnya
- Dicatat hasilnya dan dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan.

- Sisa sperma difertilisasikan dengan telur
- Dihitung telur yang terbuahi (daya fertilitas)
- Diamati fase-fase perkembangan telur
- Setelah proses fertilisasi dilakukan penghitungan Hatching Rate pada larva yang menetas

Hasil penelitian

3.5 Parameter uji penelitian

3.5.1 Parameter utama

a. Motilitas spermatozoa

Motilitas sperma merupakan parameter yang digunakan untuk memperkirakan kelangsungan hidup sperma. Paisal (2008) menyatakan bahwa sperma yang motilitasnya normal apabila lebih dari 40% atau lebih spermanya dapat bergerak dan membuahi telur. Menurut Billard & Cosson (1992), ada dua tahap yang dibutuhkan untuk mengamati motilitas agar terjadi pada saat yang bersamaan. Langkah yang pertama adalah sperma diencerkan dalam medium yang tidak menyebabkan sperma motil. Selanjutnya gerakan sperma merupakan tanda sperma telah teraktivasi, karena sperma dicampur dengan bahan yang dapat mengaktifkan dan pergerakan sperma diamati langsung dibawah mikroskop

b. Viabilitas spermatozoa

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

Dengan tidak isotonisnya bahan pengencer, banyak sperma yang mati, mengakibatkan permeabilitas membran meninggi terutama di daerah pangkal kepala, sehingga sel spermatozoa akan berwarna merah yang merupakan indikasi penyerapan warna eosin (Toelihere, 1985)

3.5.2 Parameter penunjang

a. Daya fertilitas spermatozoa

Fertilitas atau disebut juga pembuahan adalah proses bergabungnya inti sel telur dalam sitoplasma sehingga membentuk zigot. Pada dasarnya fertilisasi merupakan penyatuan atau fusi sel gamet jantan dan sel gamet betina untuk membentuk satu sel. (Tang dan Affandy, 2001). Telur yang dibuahi dan tidak terbuahi dihitung kemudian dilanjutkan dengan menghitung persentase fertilitas dengan rumus

$$\text{Fertilitas} = \frac{\Sigma \text{ telur yang terbuahi}}{\Sigma \text{ total telur}} \times 100\%$$

b. Hatching rate (HR)

Hatching Rate (daya tetas) menunjukkan persentase telur dari awal fertilisasi hingga telur yang menetas. Daya tetas telur merupakan persentase telur yang menetas dibandingkan dengan telur yang tidak menetas. Daya tetas telur dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{HR} = \frac{\Sigma \text{ telur yang menetas}}{\Sigma \text{ telur awal fertilisasi}} \times 100\%$$

c. Kualitas air

Selama waktu inkubasi telur, perlu dilakukan pengamatan kualitas air, yang meliputi pengukuran suhu, DO (oksigen terlarut, dan derajat keasaman (pH).

Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan thermometer, pengukuran oksigen terlarut menggunakan oxymeter dan pengukuran derajat keasaman menggunakan pH meter

3.6 Analisa data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman (ANOVA) . Jika dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh beda nyata (significant) atau berbeda sangat nyata (highly significant), maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Selanjutnya dilakukan uji polinomial orthogonal (uji regresi) untuk mengetahui bentuk hubungan antara perlakuan dengan parameter uji.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Sperma yang digunakan dalam penelitian didapatkan dari induk jantan dengan berat induk jantan berat rata-rata 900 gram, jumlah sperma yang diambil rata-rata sebanyak 3 ml dengan ciri fisik berwarna putih susu dan kental. Menurut Sudenda *et al.*, (2005), ciri induk jantan yang matang gonad mempunyai bobot 0,5-2 kg/ekor. Ciri-ciri sperma ikan mas yang baik menurut Krugger *et al.*, (1979), yaitu keputih-putihan dengan kekentalan yang tinggi, mengandung glukosa 5,70 mg/100ml, pH 7,53. Dan menurut Billard (1978), ion utama dalam cairan seminal adalah K^+ dan Na^+ .

Dari hasil perhitungan kepadatan sel sperma ikan mas didapatkan rata-rata konsentrasi $4,9 \times 10^8$ sel/ml. Menurut Woynarovich dan Horvath (1980), konsentrasi sperma ikan mas dalam setiap cm kubik bisa mencapai 10-20 milyar. Sedangkan menurut Bedore (1999), konsentrasi sperma bisa mencapai $5,2 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^9$ sel/ml. Banyaknya sperma yang dapat dikeluarkan dari satu ekor jantan bergantung kepada umur, ukuran dan frekuensi pengeluaran sperma (Kazakov, 1981).

4.1.1 Motilitas Sperma Kontrol

Motilitas sperma memiliki jangka waktu yang sangat singkat, oleh karena itu perlu dilakukan penanganan yang sangat hati-hati agar sperma selalu dalam keadaan optimal. Setelah ikan distriping, sperma yang ditampung dipindahkan ke dalam tabung endorf dan dilakukan pengenceran 1:1 dengan menggunakan Na-fis, karena menurut Rustidja (1985), penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit. Tabung endorf yang berisi sperma diletakkan pada wadah dengan kondisi dingin (diberi es) untuk menjaga agar kondisinya tidak berubah. Karena kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu

dan secara umum akan bertahan lebih lama dalam suhu yang rendah (Toelihere, 1981). Suhu yang rendah dapat menstabilkan kondisi fisika-kimia sperma selama perlakuan (Stoss, 1983) dan juga karena cara ini juga dianggap paling mudah (Maria *et al.*, 2006).

Sebelum sperma diberi perlakuan dengan metode elektroporasi, maka perlu diketahui terlebih dulu motilitas kontrol. Motilitas sperma diamati langsung di bawah mikroskop yaitu gerakan sperma yang merupakan tanda sperma telah teraktivasi, karena sperma ditetesi dengan air yang dapat mengaktifkan sperma (Billard & Cosson, 1992). Dari hasil pengamatan didapatkan rata-rata motilitas kontrol sebesar 73 %, hal ini sudah menunjukkan sperma dalam keadaan bagus, karena motilitas sperma normal apabila lebih dari 40 % (Paisal, 2008). Sedangkan pada sperma ikan mas segar menurut Hovart *et al.*, (2003), sebesar $87 \pm 5\%$. Sedangkan menurut Toelihere (1981), motilitas spermatozoa kurang dari 40 % kurang baik dalam proses pembuahan telur yang menyebabkan pembuahan tidak berhasil.

4.1.2 Viabilitas Sperma Kontrol

Dari hasil pengamatan terhadap viabilitas sperma kontrol yang dilakukan dengan menggunakan pewarna Hematoksin–Eosin, diketahui rata-rata viabilitas sperma kontrol sebesar 80 %. Menurut Rustidja (1985), penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit. Seperti diketahui bahwa persentase viabilitas spermatozoa menentukan kualitas sperma. Dengan persentase viabilitas yang tinggi, dapat meningkatkan keberhasilan dalam pembuahan (fertilisasi). Semakin besar jumlah viabilitas sperma, maka kemampuan untuk menembus lubang mikropil juga semakin tinggi (Hidayaturrohmah, 2007).

Untuk mempertahankan kondisi sperma agar tidak berubah, endorf yang berisi sperma diletakkan dalam wadah yang berisi es agar tetap dingin, karena akan bertahan lebih lama pada kondisi yang dingin. Toelihere (1981), menyatakan bahwa

kemampuan hidup spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan bertahan lebih lama dalam suhu yang rendah.

4.2 Kualitas Spermatozoa Setelah Elektroporasi

Ada beberapa keuntungan menggunakan sperma sebagai media transfer gen, yang pertama teknik ini dapat dilakukan secara massal, kedua, teknik ini dapat mengatasi kelemahan dari metode konvensional dalam transfer gen, yang ketiga, DNA asing dapat ditransfer ke dalam nukleus, keempat, sperma ikan mudah ditangani, karena cukup ditambahkan air untuk mengaktifkannya dan kelima sperma ikan dapat diawetkan sehingga selalu siap untuk diberi perlakuan kapan saja (Dan, 2006).

Setelah sperma diberi kejutan listrik, dilakukan penambahan pengencer sebanyak 275 μ l ke dalam *cuvette* (0,2 mm) dan dilakukan pipetting agar tercampur antara sperma dan larutan Na fisiologis. Hal ini juga dilakukan untuk mempermudah pengambilan sperma dari dalam *cuvette*. Selain itu, penambahan pengencer juga diharapkan membantu mempertahankan kondisi sperma, seperti dikatakan oleh Rustidja (1985), penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit. Menurut Soehartojo (1995), di luar testis sel spermatozoa mampu memakai sumber energi dari luar untuk melanjutkan hidupnya. Bahan utama yang dipakai sebagai sumber energi dari luar adalah fruktosa yang akan diubah menjadi asam laktat dan energi dengan bantuan enzim fruktolisin. Pemberian larutan fruktosa sebagai pengencer untuk spermatozoa ikan dimaksudkan untuk memberikan energi dan nutrisi bagi spermatozoa ikan agar dengan energi yang berupa ATP tersebut dapat meningkatkan atau memperpanjang waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa.

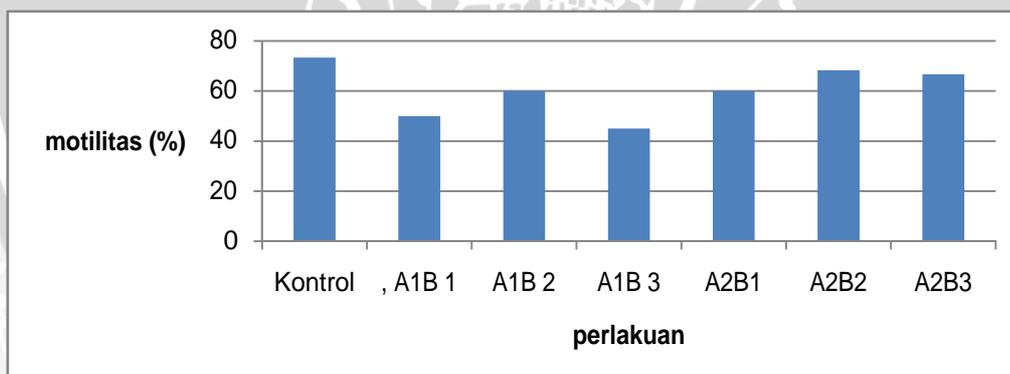
4.2.1 Motilitas spermatozoa

Dari hasil penelitian diketahui pengaruh perlakuan telah menunjukkan hasil yang berbeda terhadap motilitas sperma. Persentase motilitas sperma setelah diberi tegangan dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini :

Tabel 1 . Pengaruh pemberian tegangan dengan lama dan frekuensi kejutan yang berbeda terhadap motilitas sperma ikan mas (%)

Perlakuan	Ulangan			jumlah	rerata
	1	2	3		
Kontrol	65	80	75	220	73,3
A ₁ B ₁	60	50	40	150	50,0
A ₁ B ₂	60	70	50	180	60,0
A ₁ B ₃	40	45	50	135	45,0
A ₂ B ₁	65	65	50	180	60,0
A ₂ B ₂	75	70	60	205	68,3
A ₂ B ₃	70	70	60	200	66,7

Dari data pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa rerata persentase perlakuan yang dihasilkan ternyata lebih kecil daripada kontrol yaitu, A₁B₁ (50 %), A₁B₂ (60%), A₁B₃ (45 %), A₂B₁ (60 %), A₂B₂ (68,3 %), A₂B₃ (66,7%), jika dibandingkan dengan kontrol maka terlihat seperti ditunjukkan pada Gambar 9 .



Gambar 9. Persentase motilitas sperma pada masing-masing perlakuan

Gambar 9 menunjukkan bahwa persentase motilitas sperma lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, hal ini menunjukkan bahwa motilitas sperma dengan perlakuan elektroporasi, semakin menurun.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian kejutan listrik dengan lama dan frekuensi kejutan yang berbeda terhadap motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*), maka dilakukan analisa keragaman atau sidik ragam terhadap data yang

diperoleh (lampiran 3). Analisa keragaman atau sidik ragam motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) disajikan dalam Tabel 2

Tabel 2 . Analisa keragaman motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan kombinasi	5	1266,67	253,33	9,26	-	-
a. lama kejutan	1	800	800	29,26**	4,75	9,33
b. frekuensi kejutan	2	308,8	154,4	5,64*	3,89	6,93
c. interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan	2	157,87	78,93	2,88 ^{ns}	3,89	6,93
2. Acak	12	328,33	27,34	-		
Total	17					

** berbeda sangat nyata

*berbeda nyata

^{ns} = tidak berbeda nyata

Dari hasil sidik ragam diketahui bahwa pengaruh pemberian kejutan listrik dengan lama kejutan yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata pada motilitas sperma ikan mas, dengan nilai F hitung (29,26) > F Tabel 1 % (9,33) yang berarti menolak H_0 dan menerima H_1 . Demikian pula perlakuan frekuensi kejutan yang berbeda memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap motilitas sperma ikan mas dengan nilai F hitung (5,64) > F Tabel 5 % yaitu (3,89) yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Sedangkan interaksi antara lama kejutan dan frekuensi tidak berpengaruh terhadap motilitas sperma ikan mas didapatkan nilai F hitung (2,88) < F Tabel 5 % (3,89).

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh masing-masing perlakuan lama dan frekuensi yang berbeda terhadap daya motilitas sperma elektroporasi maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil sebagaimana tersaji dalam Tabel 3 dan Tabel 4.

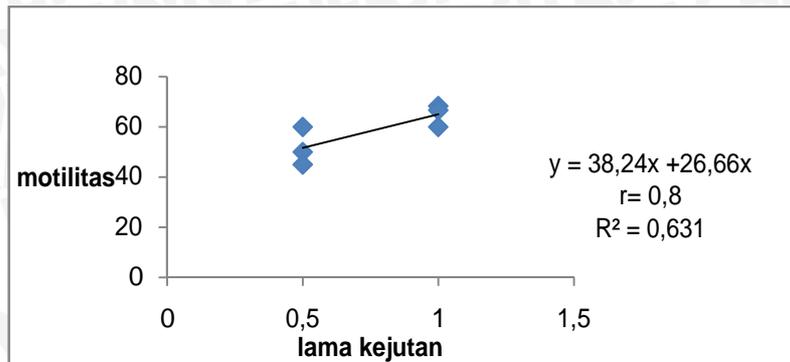
Tabel 3. Uji Beda Nyata Terkecil lama kejutan terhadap motilitas

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A1=0,5 ms	51,67	a
A2= 1ms	65	b

Ket. Notasi sama berarti tidak berbeda

Dari Tabel 3 dapat disimpulkan bahwa perlakuan pemberian kejutan dengan lama kejutan 1 ms yang lebih baik dibandingkan dengan lama kejutan 0,5 ms.

Selanjutnya didapat persamaan regresi linier $y = 38,24 + 26,66x$ merupakan bentuk hubungan antara lama kejutan dan motilitas seperti tertera pada Gambar 10.



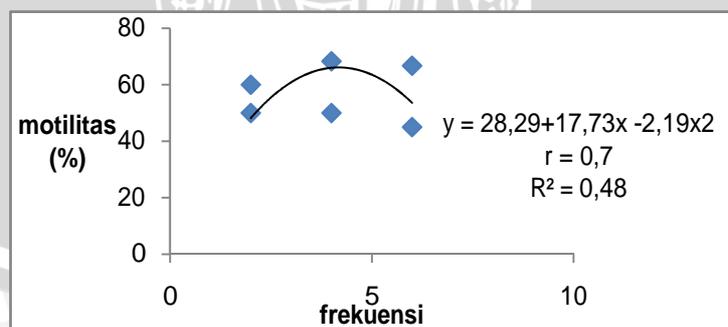
Gambar 10. Hubungan antara lama kejutan dan motilitas

Tabel 4. Uji Beda Nyata Terkecil Frekuensi terhadap motilitas

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
B1=2 kali	55,0	a
B3=6 kali	55,83	ab
B2= 4 kali	64,17	b

Ket. Notasi sama berarti tidak berbeda

Pada Tabel 4 uji BNT frekuensi menunjukkan bahwa pemberian kejutan dengan frekuensi 4 kali memberikan hasil yang paling baik daripada pemberian kejutan 6 kali dan yang paling rendah pada pemberian frekuensi 2 kali. Dan selanjutnya dilakukan uji regresi dan didapatkan hasil berupa regresi kuadratik yaitu $y = 28,29 + 17,73x - 2,19x^2$ dengan nilai $r = 0,69$ dan $R^2 = 0,48$ dengan titik puncak 64,17 % pada frekuensi 4,05 yang ditunjukkan seperti pada Gambar 11



Gambar 11. Hubungan antara frekuensi kejutan dan motilitas

Pengaruh utama dari kejutan terhadap sel spermatozoa ialah penurunan motilitas dan daya hidup. Perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Jumlah spermatozoa motil mengalami penurunan disertai

pelepasan enzim, perpindahan ion melewati membran, dan penurunan kandungan lipid seperti fosfolipid dan kolesterol yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas struktur membran plasma (Weitze & Petzoldt 1992, White 1993), serta penurunan kemampuan sel spermatozoa untuk mengontrol aliran Ca^{2+} (Bailey & Buhr 1994). Dengan metode elektroporasi, motilitas sperma telah diamati setelah elektroporasi dengan variasi kekuatan kejutan dan lama kejutan, bahwasanya motilitas sperma menurun dengan kenaikan voltase kejutan (Cheng, 2003). Elektroporasi dapat menyebabkan hilangnya protein pada seminal plasma (Collares, 2010). Keutuhan membran plasma sangat berkorelasi dengan motilitas spermatozoa (Yu dan Leibo 2002). Apabila membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa akan kehilangan motilitasnya dan mengakibatkan kematian. Selain itu, dikatakan oleh Weaver (1996), jika tegangan yang diberikan terhadap sperma berlebihan, maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah dan hal ini dapat memicu kerusakan pada membran atau selaput sperma.

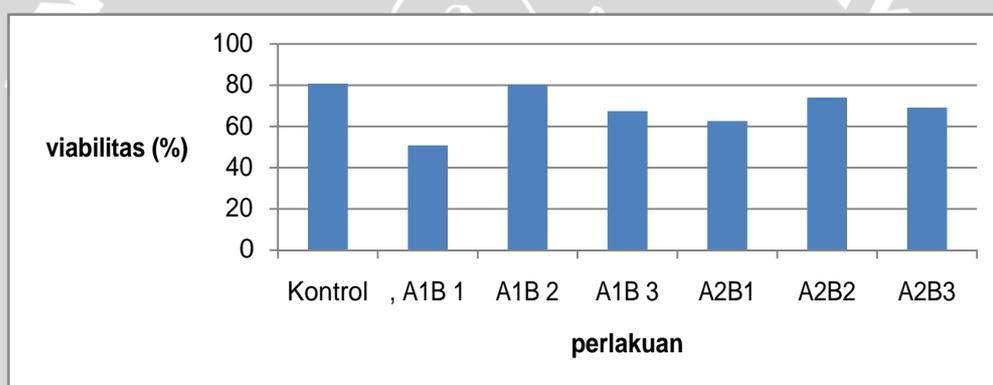
4.2.2 Viabilitas Spermatozoa

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan menggunakan Hemaktosilin Eosin. Apabila spermatozoa tersebut mati, maka permeabilitas membran meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dan spermatozoa yang mati (Tang dan Afandy, 2001). Dengan tidak isotonisnya bahan pengencer, banyak sperma yang mati, mengakibatkan permeabilitas membran meninggi terutama di daerah pangkal kepala, sehingga sel spermatozoa akan berwarna merah yang merupakan indikasi penyerapan warna eosin (Toelihere, 1985). Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh pemberian tegangan dengan lama dan frekuensi yang berbeda terhadap daya viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Perlakuan	Ulangan			Rerata
	1	2	3	
Kontrol	72,30	87,73	82,3	80,77
A ₁ B ₁	48,95	47,616	56,13	50,89
A ₁ B ₂	83,06	84,06	73,88	80,33
A ₁ B ₃	70,90	60,88	70,58	67,45
A ₂ B ₁	64,14	51,08	72,61	62,61
A ₂ B ₂	68,61	72,24	81,20	74,01
A ₂ B ₃	70,19	68,24	69,01	69,14

Dari Tabel 5 diketahui rerata persentase perlakuan, yaitu A₁B₁ (51,23 %), A₁B₂ (80,33 %), A₁B₃ (67,45%), A₂B₁ (62,61%), A₂B₂ (74,01%), A₂B₃ (69,14%) lebih rendah jika dibandingkan dengan sperma kontrol (80,77%), berarti terjadi penurunan daya viabilitasnya (Gambar 12).



Gambar 12. Persentase daya viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) pada masing-masing perlakuan

Pada Gambar 12 menunjukkan perlakuan lama kejutan 0,5 ms dengan frekuensi kejutan 4 kali (A₁B₂) mempunyai nilai viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lain.

Untuk mengetahui apakah perlakuan dengan kejutan listrik 40 volt dengan lama dan frekuensi kejutan yang berbeda berpengaruh terhadap daya viabilitas spermatozoa, maka dilakukan analisa keragaman atau sidik ragam yang disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Analisa keragaman viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. perlakuan kombinasi	5	1528,23	305,64	7,47	-	-
a. lama kejutan	1	25,14	25,14	0,61 ^{ns}	4,75	9,33
b. frekuensi kejutan	2	1258,27	629,13	15,37 ^{**}	3,89	6,93
c. interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan	2	244,82	122,41	2,99 ^{ns}	3,89	6,93
2. Acak	12	491	40,91	-		
Total	17					

^{**} berbeda sangat nyata

^{ns} = tidak berbeda nyata

Hasil dari perhitungan analisa keragaman atau sidik ragam yang disajikan pada Tabel 6, menunjukkan bahwa perlakuan dengan lama kejutan yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap daya viabilitas sperma ikan mas dengan nilai F hitung (0,61) lebih kecil daripada nilai F Tabel 5 % dan 1 %, yaitu 4,75 dan 9,33 yang berarti menolak H_1 dan menerima H_0 . Sedangkan pemberian frekuensi kejutan yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap daya viabilitas sperma ikan mas dengan nilai F hitung (15,371) > F tabel 1 % (6,93) yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Interaksi antara lama kejutan dan frekuensi kejutan juga tidak memberikan pengaruh terhadap daya viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan nilai F hitung (2,99) lebih kecil daripada nilai F Tabel 5 % (4,75) yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1 .

Selanjutnya dilakukan uji BNT untuk mengetahui pengaruh masing-masing frekuensi terhadap daya viabilitas sperma ikan mas yang disajikan pada Tabel 7.

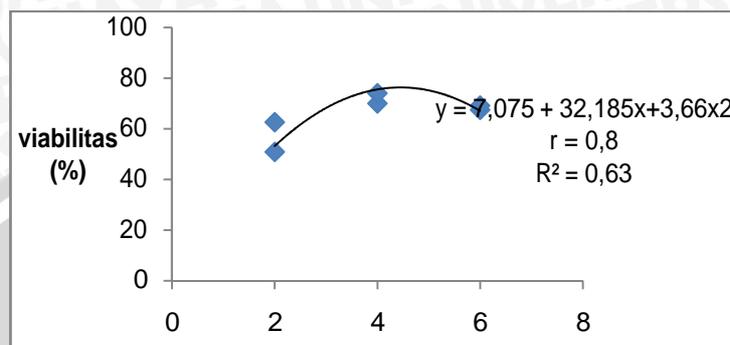
Tabel 7. Uji BNT Frekuensi kejutan terhadap viabilitas

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
B1=2 kali	56,75	a
B3=6 kali	68,3	b
B2=4 kali	77,175	c

Ket. Notasi sama berarti tidak berbeda

Pada Tabel uji BNT dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik adalah menggunakan frekuensi kejutan 4 kali karena nilai (77,175 %) diikuti oleh frekuensi kejutan 6 kali (68,3 %) dan perlakuan terendah pada frekuensi kejutan 2 kali

(56,75%). Selanjutnya dilakukan uji regresi untuk mengetahui bentuk hubungan antara frekuensi kejutan dengan persentase viabilitas yang didapatkan persamaan regresi kuadratik $y = 7,075 + 32,185x - 3,66x^2$ dengan $R^2 = 0,63$ dan $r = 0,8$ yang mempunyai titik puncak 77,89 pada frekuensi 4,4 kali.



Gambar 13. Hubungan antar frekuensi dan viabilitas

Pada kejutan 4 kali, terjadi penurunan setengah dari kekuatan kejutan, sehingga akan berkurang panasnya pada kejutan keempat (Anonymous, 2009). Hukum joule yang pertama menyebutkan bahwa satuan tekanan listrik atau pemanasan adalah proporsional terhadap waktu resistensi "square wave". Akibat pemanasan ini biasanya dapat menyebabkan kematian sel selama elektroporasi, karena kenaikan suhu yang berlebihan, dan ini merupakan efek yang tidak dapat dihindari. Secara fisika, efek elektroporasi pada membran sel dapat menyebabkan partikel asing masuk. Setelah itu, terjadi pengurangan besarnya kejutan listrik yang akan berlanjut dengan perpindahan partikel asing melewati pori yang terbuka ketika elektroporasi selama menghasilkan panas yang secara signifikan menurunkan panasnya. Sebagai contoh, penurunan setengah dari kekuatan kejutan akan berkurang panasnya pada kejutan keempat (Anonymous, 2009). Karena kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan bertahan lebih lama dalam suhu yang rendah (Toelihere, 1981). Dengan demikian, mempertahankan suhu selama elektroporasi akan menjadi sangat penting bagi proses elektroporasi (Anonymous, 2006). Hal ini dimungkinkan karena diperkirakan 20-50 % sel yang tersisa dapat hidup setelah telah

dielektroporasi sehingga dapat dipertimbangkan lagi dalam proses transfer pada hampir seluruh sel (Andreason and Evans, 1988). Selain itu suhu juga berperan penting dalam viabilitas, dan ini dipercaya mempengaruhi efisiensi elektroporasi. Andreason and Evans (1989), menyatakan bahwa inkubasi sel dalam es memperpanjang pori-pori sel membran membuka kembali dan meningkatkan daya viabilitas sel.

Penurunan viabilitas pada perlakuan dapat terjadi karena pori-pori membran akan lebih lama menutupnya jika digunakan voltase yang tinggi dan kejutan yang lama. Kondisi ini dapat menyebabkan pori membran sel tidak dapat menutup kembali yang membahayakan, sehingga sel akan mati (Shimogori, 2008) dan juga bisa disebabkan tegangan yang diberikan terhadap sperma dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga menyebabkan sel rusak atau pecah dan hal ini memicu kerusakan pada membran atau selaput sperma (Weaver, 1996)

Penurunan nilai viabilitas dapat juga disebabkan oleh kenaikan suhu selama proses elektroporasi, hal ini mungkin terjadi karena sperma tercampur dengan Na-fisiologis (mengandung ion) dan juga dapat disebabkan pendinginan *cuvette* kurang maksimal. Untuk meningkatkan resistance sampel dapat dilakukan dengan cara 1) mengurangi temperature sampel, 2) mengurangi kadar ion pada pengencer, 3) mengurangi volume cairan dalam *cuvette* pada kasus media dengan resistance rendah. Sehingga apabila sperma banyak mengandung ion, maka resistance dari sperma meningkat sehingga waktu pemberian tegangan semakin lama (*pulse length*) sehingga suhunya meningkat yang menyebabkan sperma mati (Anonymous, 2006)

Elektroporasi dengan menggunakan metode "square wave" dapat menghantarkan rangkaian kejutan lebih dari satu pada sel. Waktu antara masing-masing kejutan dinamakan interval kejutan (*interval pulse*) yang telah tesrsetting otomatis jumlah kejutan 1 dan interval kejutan 0, masing-masing dapat disesuaikan

dengan memasukkan jumlah dan frekuensi kejutan sesuai yang dibutuhkan (Anonymous, 2006). Karena itu untuk efisiensi yang lebih tinggi dan agar jaringan yang rusak lebih sedikit, penggunaan voltase yang rendah dan jumlah kejutan yang minimum, dan penggunaan “square wave” generator disarankan untuk elektroporasi (Shimogori, 2009).

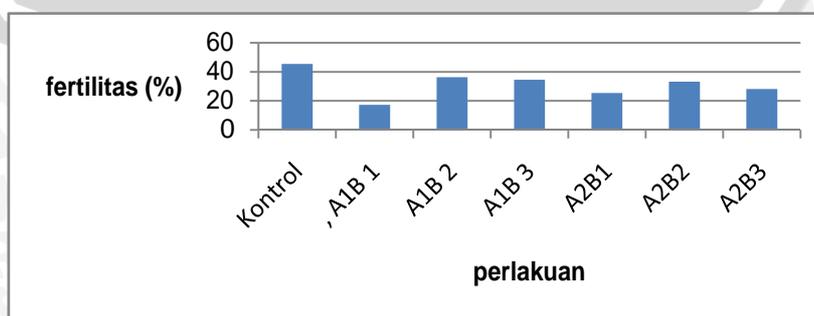
4.3 Daya Fertilitas Sperma

Sperma yang telah diberi perlakuan dipergunakan untuk membuahi sel telur untuk mengetahui daya fertilitas sperma yang telah diberi perlakuan kejutan. Jumlah telur yang dbuahi sebanyak 0,1 gram (\pm 100 butir). Telur yang tidak terfertilisasi berwarna putih, sedangkan telur yang terfertilisasi berwarna kuning. Daya fertilitas yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Daya fertilisasi Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (%)

Perlakuan	Ulangan			Rerata
	1	2	3	
Kontrol	40	56,36	40	45,45
A ₁ B ₁	11,8	30	10	17,26
A ₁ B ₂	49,09	19,09	40,9	36,36
A ₁ B ₃	23,63	64,54	15,45	34,54
A ₂ B ₁	24,54	28,18	23,63	25,45
A ₂ B ₂	34,54	25,45	40	33,3
A ₂ B ₃	29,09	14,54	40,9	28,17

Dari data pada Tabel 8 dapat diketahui bahwa rata-rata persentase daya fertilitas sperma yang telah diberi tegangan yakni A₁B₁ (17,26%), A₁B₂ (36,36%), A₁B₃ (34,54%), A₂B₁ (25,45%), A₂B₂ (33,3%), A₂B₃ (28,17%) yang lebih rendah daripada nilai kontrol (45,45%).



Gambar 14. Hasil fertilitas sperma pada masing-masing perlakuan

Pada Gambar 14 memperlihatkan bahwa fertilitas pada hasil perlakuan lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol. Untuk mengetahui apakah pemberian kejutan listrik 40 volt dengan lama dan frekuensi yang berbeda akan memberikan pengaruh terhadap daya fertilitas sperma ikan mas, maka dilakukan analisa keragaman atau sidik ragam (lampiran 5). Hasil sidik ragam disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Analisa keragaman daya fertilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
a. perlakuan kombinasi	5	727,48	145,496	-	-	-
d. lama kejutan	1	0,44	0,44	0,01 ^{ns}	4,75	9,33
e. frekuensi kejutan	2	579,005	289,025	11,58 ^{**}	3,89	6,93
f. interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan	2	148,035	74,01	2,96 ^{ns}	3,89	6,93
2. Acak	12	299,48	24,95	-	-	-
Total	17					

** berbeda sangat nyata

^{ns} = tidak berbeda nyata

Dari perhitungan sidik ragam pada Tabel 9 diketahui bahwa pemberian tegangan listrik dengan lama kejutan yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap daya fertilitas sperma ikan mas dengan nilai F hitung lebih kecil daripada nilai F Tabel 5 ($0,01 < 4,75$) yang berarti menolak H_1 dan menerima H_0 . Begitu pula dengan pemberian perlakuan interaksi antara lama kejutan dan frekuensi kejutan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap daya fertilitas sperma dengan nilai F hitung 2,96 lebih kecil dari F Tabel 5 % (3,89) walaupun terlihat penurunan jumlah telur yang terfertilisasi. Tetapi perlakuan frekuensi kejutan yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata yaitu F hitung (11,58) > F 1 % (6,93 %) yang berarti menolak H_0 dan menerima H_1 .

Untuk mengetahui pengaruh masing-masing frekuensi terhadap daya fertilitas sperma ikan mas, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil yang disajikan dalam Tabel 10.

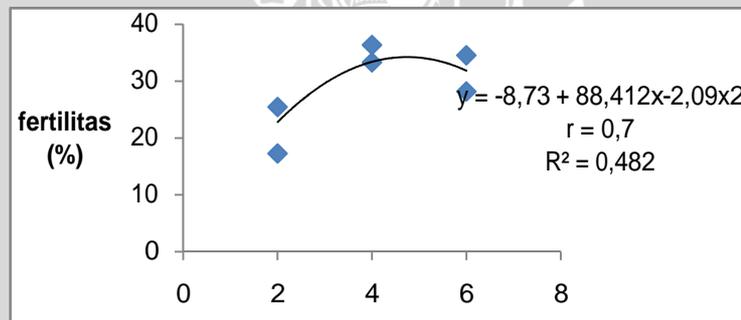
Tabel. 10 Uji Beda Nyata Terkecil Frekuensi

Perlakuan	Rerata	Frekuensi
B1=2 kali	21,36	a
B3= 6 kali	31,36	b
B2 = 4 kali	34,37	b

Ket. Notasi sama berarti tidak berbeda

Dari hasil Uji Beda Nyata Terkecil yang telah dilakukan, diketahui bahwa perlakuan terbaik yaitu pada pemberian frekuensi kejutan sebanyak 4 kali dan 6 kali dengan fertilitas 34,37 dan 31,16 %, sedangkan yang terendah pada kejutan 2 kali (21,36).

Selanjutnya dilakukan uji regresi untuk mengetahui bentuk hubungan frekuensi dengan daya fertilitas yang didapatkan persamaan regresi $y = -8,73 + 19,22x - 2,09x^2$ dengan nilai $R^2 = 0,482$ dan $r = 0,7$, yang mempunyai titik puncak sebesar 35,46 % pada frekuensi 4,6 kali, seperti terlihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Hubungan antara frekuensi kejutan dan fertilitas

Jika dibandingkan dengan rata-rata sperma kontrol maka terjadi penurunan daya fertilitas. Salah satu permasalahan fertilisasi pada budidaya ikan air tawar adalah rendahnya tingkat fertilisasi dari spermatozoa di dalam air. Hal ini mengakibatkan banyaknya sel telur yang tidak terbuahi secara sempurna (Masrizal dan Efrizal, 1997). Kang *et al.*, (1999), menyatakan bahwa morfologi sperma yang telah dielektroporasi tereduksi menjadi lebih tipis. Bahwasanya pola lamanya sperma motil, daya fertilisasi dan daya tetas, sama dengan yang telah ditunjukkan oleh tingginya daya fertilitas dan daya tetas setelah perlakuan elektroporasi (Collares, 2010).

Keutuhan membran spermatozoa terutama membran plasma mutlak untuk menjamin kelangsungan hidup dan keberhasilannya dalam membuahi sel telur. Hal tersebut selain berfungsi melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik, membran plasma juga berperan penting sebagai filter yang baik bagi pertukaran-pertukaran zat-zat intra dan ekstraseluler yang dipertahankan dalam proses metabolisme (Garner dan Hafez, 2000). Rusaknya membran sel akan meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga bahan-bahan yang semestinya tidak boleh melewati membran sel dapat secara bebas keluar masuk sel dan akhirnya integritas sel spermatozoa terganggu (Agarwall *et al.*, 2003). Namun menurut Sin (2001), bahwasanya motilitas sperma ikan merupakan parameter kelangsungan hidup sperma, yang akan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan dan lama kejutan. Akan tetapi namun kelulushidupan dari embrio yang dibuahi dengan sperma yang telah dielektroporasi dan sperma yang tanpa dielektroporasi tidak tampak perbedaan. Pada penelitian ini menggunakan 25 μ l sperma yang telah dielektroporasi dengan rata-rata jumlah sperma $4,9 \times 10^8$ sel/ml yang digunakan untuk membuahi 0,1 gram telur dengan jumlah telur ± 100 butir. Hal ini menunjukkan bahwa motilitas sperma yang menurun masih dapat digunakan untuk membuahi telur dengan ditunjang jarak sperma dan telur yang relatif dekat (dalam wadah cawan petri) serta dalam proses fertilisasi cawan petri digoyang-goyang untuk membantu letak sperma agar lebih dekat dengan telur. Menurut Hidayaturrohman (2001), kondisi motilitas *slow progressive* mempunyai kemampuan untuk menembus lubang mikropil cukup lemah, pembuahan bisa saja terjadi apabila jarak antara spermatozoa dan sel telur sangat dekat. Rendahnya pembuahan spermatozoa dalam fertilisasi buatan ini juga disebabkan oleh aktivitas spermatozoa yang relatif singkat (Nurman, 1998). Hal tersebut dapat disebabkan oleh singkatnya waktu viabilitas dan motilitas dari spermatozoa, sehingga kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil pada sel telur rendah.

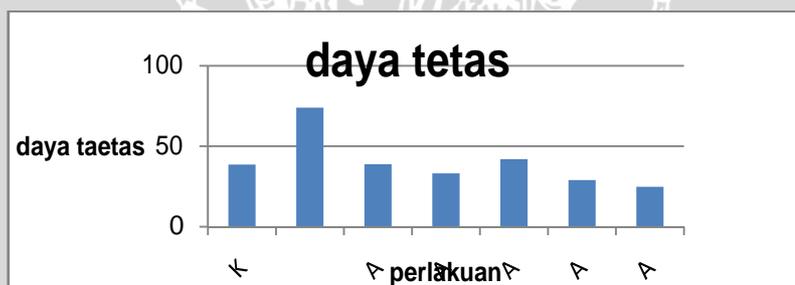
4.4 Daya Tetas Telur (Hatching Rate)

Telur yang sudah terfertilisasi diamati perkembangannya sampai menetas, selama 72 jam. Hasil pengamatan telur yang sudah dibuahi dan dipelihara selama 72 jam sampai menetas, didapatkan daya tetas telur (*Hatching Rate*) dari tiap perlakuan tertera pada Tabel 11.

Tabel. 11 Daya Tetas Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Perlakuan	ulangan			Rata-rata
	1	2	3	
Kontrol	38,63	43,54	41,87	38,63
A ₁ B ₁	53,8	24,24	72,72	74,01
A ₁ B ₂	7,40	71,42	37,77	38,86
A ₁ B ₃	46,15	29,94	23,52	33,20
A ₂ B ₁	33,33	61,90	30,76	41,99
A ₂ B ₂	44,73	28,57	13,63	28,97
A ₂ B ₃	18,75	31,25	24,44	24,81

Dari Tabel 11 dapat diketahui bahwa perlakuan A₁B₁ mempunyai nilai HR paling tinggi dengan nilai rata-rata 74,01 % dengan perlakuan pemberian tegangan 40 Volt dengan lama kejutan 0,5 dan frekuensi kejutan 2 kali.



Gambar 16. Grafik daya tetas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap daya tetas dilakukan analisa keragaman /sidik ragam (lampiran 6) disajikan pada Tabel 12 berikut ini.

Tabel. 12. Analisa keragaman daya tetas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. perlakuan kombinasi	5	1286,60	257,32			
a. lama kejutan	1	352,01	352,01	0,90 ^{ns}	4,75	9,33
b. frekuensi kejutan	2	932,14	466,07	1,19 ^{ns}	3,89	6,93
c. interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan	2	2,45	1,225	0,003 ^{ns}	3,89	6,93
2. Acak	12	4676,82	389,735			
Total	17					

^{ns} = tidak berbeda nyata

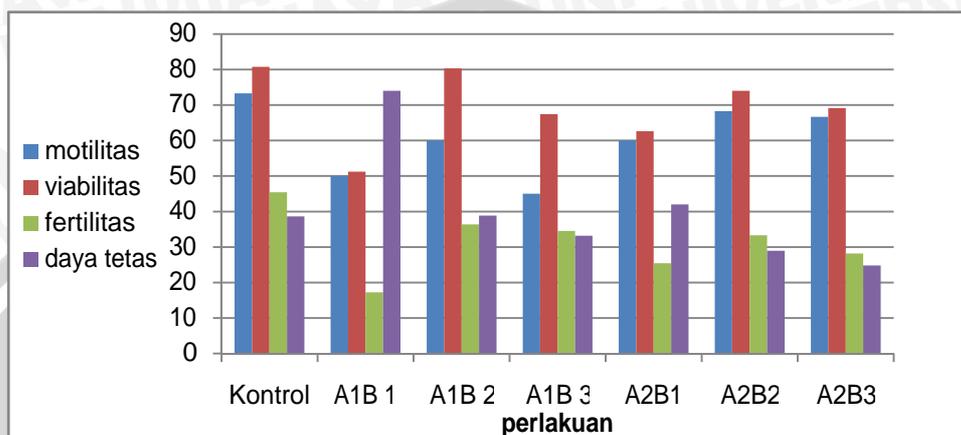
Dari analisa keragaman atau sidik ragam pada Tabel 12 diketahui pemberian kejutan listrik dengan lama kejutan dan frekuensi maupun interaksi lama kejutan dan frekuensi ternyata tidak berpengaruh terhadap daya tetas ($F_{hitung} < F_{5\%}$) yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1 .

Keberhasilan pembuahan sangat tergantung pada kualitas dan kuantitas sperma (Yustina, 2003). Daya tetas dari embrio yang telah difertilisasikan secara in vitro dengan sperma yang telah dielektroporasi mengalami penurunan saat kejutan dinaikkan (Tsai, 2000). Daya tetas meningkat ketika tekanan osmotik berbeda diterapkan pada sel sperma, yang menunjukkan bahwa elektroporasi tidak berpengaruh pada HR. HR mempunyai korelasi yang signifikan dengan lamanya sperma motil, yang mengindikasikan bahwa gerakan sperma dapat menentukan keberhasilan telur menetas, penggunaan kekuatan kejutan lamanya kejutan dan lamanya kejutan lebih efektif untuk transfer gen. Survival rate lebih rendah ketika voltase kejutan dinaikkan. Analisa morfologi sperma yang telah dielektroporasi telah dilakukan dengan mikroskop *electron*, menunjukkan bahwa pada umumnya terjadi kecacatan pada terpisahnya ekor dengan *filamen microtubule*. Efisiensi transfer gen tergantung pada kekuatan kejutan, lamanya kejutan dan frekuensi kejutan. Meskipun demikian, kondisi saat elektroporasi harus tetap diperhatikan. Dan dari tren umum yang telah diamati menunjukkan bahwa kekuatan kejutan yang digunakan untuk transfer gen lebih efisien jika dinaikkan. Kejutan yang lebih dari satu pada daya kejutan tampaknya lebih efisien dalam transfer gen (Sin, 2008).

Selain kualitas sperma, kualitas telur juga menentukan efisiensi daya tetas dan survival rate dari fertilisasi buatan, telur yang sudah matang mempunyai kualitas baik dengan adanya "*oil droops*" yang harus diketahui dulu sebelum elektroporasi dilakukan (Chen, 2002).

4.5 Hasil Pengamatan Keseluruhan Parameter (Motilitas, Viabilitas, Daya Fertilitas Sperma dan Daya Tetas Telur)

Hasil pengamatan keseluruhan parameter dengan perlakuan pemberian kejutan 40 Volt dengan lama dan frekuensi kejutan yang berbeda yaitu parameter motilitas, viabilitas, daya fertilitas dan daya tetas ditampilkan. Pada Gambar 17.



Gambar 17. Grafik Hubungan Antar Parameter

4.5.1 Motilitas Dengan Viabilitas Sperma

Dari Gambar 17 dapat diketahui bahwa pada saat nilai motilitas mengalami penurunan, begitupula dengan viabilitas secara umum juga mengalami penurunan. Daya tahan hidup sperma dipengaruhi oleh pH, tekanan osmotik, elektrolit, non elektrolit, suhu dan cahaya (Gusrina, 2008). Dalam hal ini Robertis dan Robertis (1979), menyatakan bahwa permeabilitas membran erat kaitannya dengan transportasi nutrisi yang diperlukan pada metabolisme sel dalam menghasilkan energi. Hal ini didukung oleh Jeyendran (1986), yang menyatakan bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa .

4.5.2 Motilitas Dengan Daya Fertilitas Sperma

Dari Gambar 17 terlihat ada hubungan antara motilitas dengan daya fertilitas sperma yang telah dielektroporasi. Banyak parameter yang dipergunakan untuk mengetahui biologi sperma, walaupun parameter motilitas biasanya digunakan untuk perkiraan kualitas dan daya fertilitas sperma (Cambeyron dan Zohar, 1990).

Motilitas sperma dan daya fertilitas sperma merupakan parameter yang penting ketika digunakan untuk membandingkan sperma yang berbeda dan menilai kemampuannya untuk membuahi (fertilisasi) (Billard *et al.*, 1997).

Lamanya spermatozoa ketika motil sangatlah penting karena lamanya waktu sperma berinteraksi dengan sel telur selama proses fertilisasi (Collares, 2010), Pembuahan satu telur hanya membutuhkan satu spermatozoa bagian kepalanya masuk ke dalam telur melalui *mycropyle*, sedangkan bagian ekornya tetap berada tertinggal di luar. *Cytoplasma* dan *chorion* merenggang dan semakin tersumbat yang akan segera menutup *mycropyle* untuk menghalangi masuknya spermatozoa lainnya. Sumantadinata (1983), mengatakan, setelah memasuki telur, inti spermatozoa mulai membesar dan kromosomnya mengalami perubahan sehingga memungkinkan untuk berhimpun dengan kromosom dari sel telur fase awal pembelahan.

4.5.3 Viabilitas Dengan Daya Fertilitas Sperma

Dari Gambar 17 terlihat ada hubungan antara daya fertilitas sperma, viabilitas menurun dan fertilitas menurun. Seperti diketahui bahwa persentase viabilitas spermatozoa menentukan kualitas sperma. Dengan persentase viabilitas yang tinggi, dapat meningkatkan keberhasilan dalam pembuahan (fertilisasi). Semakin besar jumlah viabilitas sperma, maka kemampuan untuk menembus lubang mikropil juga semakin tinggi (Hidayaturrohman, 2007)

Menurut Marawali *et al.*, (2001), fruktosa adalah substrat energi utama di dalam plasma semen yang telah diproduksi kelenjar vesikularis. Selain itu fruktosa merupakan turunan karbohidrat yang dapat dijadikan sumber energi untuk mendukung pergerakan (motilitas) dan ketahanan spermatozoa (Teolihere, 1981). Fungsi bahan pengencer ialah merupakan sumber energi, melindungi sperma terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat, mencegah pengaruh yang merugikan seperti perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat, mempertahankan

tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, menghambat pertumbuhan bakteri, meningkatkan volume semen sehingga dapat digunakan untuk inseminasi dan memproteksi sel spermatozoa selama pembekuan (Hafez 2000).

Survival rate lebih rendah ketika voltase kejutan dinaikkan. Ini mungkin disebabkan karena daya viabilitas sperma yang telah dielektroporasi. Analisa morfologi sperma yang telah dielektroporasi telah dilakukan dengan mikroskop *electron*, menunjukkan bahwa pada umumnya terjadi kecacatan pada terpisahnya ekor dengan *filamen microtubule*. Efisiensi transfer gen tergantung pada kekuatan kejutan, lamanya kejutan dan frekuensi kejutan. Meskipun demikian, kondisi saat elektroporasi harus tetap diperhatikan. Dan dari tren umum yang telah diamati menunjukkan bahwa kekuatan kejutan yang digunakan untuk transfer gen lebih efisien jika dinaikkan. Kejutan yang lebih dari satu pada daya kejutan tampaknya lebih efisien dalam transfer gen (Sin, 2008).

4.5.4 Daya Fertilitas Dengan Daya Tetas Telur

Pada gambar 17 menunjukkan tidak ada hubungan antara daya fertilitas dengan daya tetas telur. Daya fertilitas tinggi, daya tetas ada yang meningkat dan ada yang menurun. Kelulushidupan embrio yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma yang tanpa perlakuan tidak tampak perbedaan (Sin, 2001). Penetasan telur dapat disebabkan oleh gerakan telur, peningkatan suhu, intensitas cahaya atau pengurangan tekanan oksigen. Dalam penekanan mortalitas telur, yang banyak berperan adalah faktor kualitas air dan kualitas telur selain penanganan secara intensif (Sumantadinata, 1983),

Penetasan terjadi karena 1) kerja mekanik, oleh karena embrio sering mengubah posisinya karena kekurangan ruang dalam cangkangnya, atau karena embrio telah lebih panjang dari lingkungan dalam cangkangnya (Lagler et al. 1962). Dengan pergerakan-pergerakan tersebut bagian telur lembek dan tipis akan pecah sehingga embrio akan keluar dari cangkangnya. 2) Kerja enzimatik, yaitu enzim dan

zat kimia lainnya yang dikeluarkan oleh kelenjar endodermal di daerah pharink embrio. Enzim ini disebut *chorionase* yang kerjanya bersifat mereduksi *chorion* yang terdiri dari *pseudokeratine* menjadi lembek. Sehingga pada bagian cangkang yang tipis dan terkena *chorionase* akan pecah dan ekor embrio keluar dari cangkang kemudian diikuti tubuh dan kepalanya.

4.6 Kualitas Air

Selama inkubasi telur berlangsung, dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi oksigen terlarut (DO), suhu dan pH pada media inkubasi telur. Faktor-faktor tersebut harus diperhatikan selama inkubasi berlangsung, karena air sebagai media inkubasi telur sehingga mempengaruhi kelangsungan hidup telur hingga menetas menjadi larva.

4.6.1 Suhu

Berdasarkan hasil pengukuran suhu yang dilakukan dengan menggunakan termometer, didapatkan suhu yang berkisar antara 27-28 ° C. Pada inkubasi telur menggunakan inkubator sehingga suhu merata, selain itu juga dipasang 4 buah heater air untuk mempertahankan suhu. Karena menurut Sunarma (2004), penetasan telur dan penyerapan *yolk sac* (kuning telur) akan lebih cepat terjadi pada suhu yang lebih tinggi. Telur akan menetas tergantung dari suhu air wadah penetasan dan suhu udara. Jika suhu semakin panas, telur akan menetas semakin cepat. Begitu juga sebaliknya, jika suhu rendah, penetasannya semakin lama (Gusrina, 2008).

4.6.2 Oksigen Terlarut

Pengukuran oksigen terlarut pada air media inkubasi telur didapatkan hasil 6,6 ppm dan selama penetasan telur, air dialirkan terus menerus. Gusrina (2008), menyatakan bahwa seluruh telur yang akan ditetaskan harus terendam air. Telur yang telah dibuahi berwarna kuning cerah kecoklatan, sedangkan telur yang tidak

dibuahi berwarna putih pucat. Di dalam proses penetasan telur diperlukan suplai oksigen yang cukup. Selain itu suhu air sangat berpengaruh terhadap jumlah oksigen terlarut didalam air. Jika suhu tinggi, air akan lebih lekas jenuh dengan oksigen disbanding dengan suhunya rendah. Hal ini dilihat dari peningkatan suhu air maka kelarutan oksigen akan berkurang oksigen terlarut yang optimal adalah sebesar 6-8 ppm.

4.6.3 Derajat Keasaman

Derajat keasaman yang didapatkan dari pengukuran air media inkubasi telur didapatkan pH 7,8. Menurut Gusrina (2008) pH (singkatan dari “*puissance negative de H*”), yaitu logaritma negatif dari kepekatan ion-ion H yang terlepas dalam suatu perairan dan mempunyai pengaruh besar terhadap kehidupan organisme perairan, sehingga pH perairan dipakai sebagai salah satu untuk menyatakan baik buruknya sesuatu perairan.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

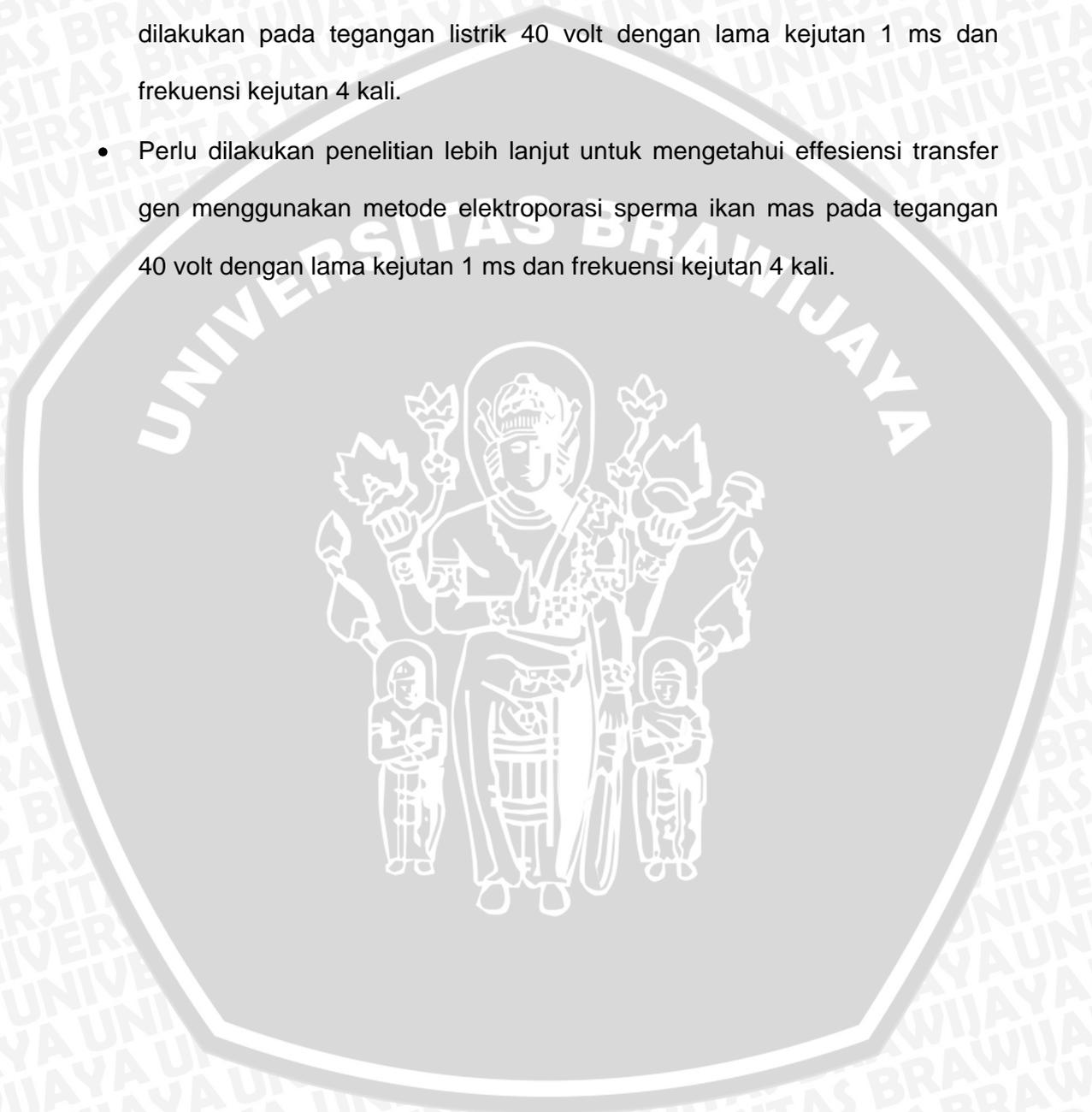
Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

- Rata-rata konsentrasi sperma ikan mas adalah $4,9 \times 10^8$ sel/ ml dengan panjang ekor sperma $\pm 7 \mu\text{m}$ dan panjang kepala sperma $\pm 3 \mu\text{m}$
- Pemberian tegangan listrik 40 volt dengan lama kejutan yang berbeda (0,5 ms dan 1,0 ms) berpengaruh terhadap motilitas, tetapi tidak berpengaruh terhadap viabilitas, fertilitas dan daya tetas. Hubungan antara lama kejutan dengan motilitas berupa regresi linier dengan persamaan $y = 38,24 + 26,66x$ dengan lama kejutan terbaik 1 ms yang memberikan nilai motilitas 65 %.
- Pemberian tegangan listrik 40 volt dengan frekuensi kejutan yang berbeda (2 kali, 4 kali dan 6 kali) tidak berpengaruh terhadap daya tetas tetapi berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan fertilitas.
 - Hubungan antara frekuensi dengan motilitas berupa regresi kuadratik dengan $y = 28,29 + 17,73 x - 2,19 x^2$ dengan nilai $r = 0,7$ dan $R^2 = 0,48$ yang mempunyai titik puncak 64,18 % pada frekuensi 4,05 kali.
 - Hubungan antara frekuensi dengan viabilitas berupa regresi kuadratik dengan $y = 7,075 + 32,185 x - 3,66 x^2$ dengan $R^2 = 0,63$ dan $r = 0,8$ yang mempunyai titik puncak 77,89 % pada frekuensi 4,4kali
 - Hubungan antara frekuensi dengan viabilitas berupa regresi kuadratik dengan $y = -8,73 + 19,22x - 2,09 x^2$ dengan nilai $R^2 = 0,482$ dan $r = 0,7$, yang mempunyai titik puncak 35,46% pada frekuensi 4,6 kali.
- Interaksi lama kejutan dan frekuensi yang berbeda tidak memberikan pengaruh nyata pada motilitas, viabilitas, fertilitas dan daya tetas
- Kualitas air selama inkubasi telur masih dalam batas toleransi penetasan telur yaitu suhu berkisar $27-28^{\circ}\text{C}$, O_2 berkisar 6,6 ppm dan pH 7,8.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan sebagai berikut :

- Elektroporasi sperma ikan mas sebagai media transfer gen sebaiknya dilakukan pada tegangan listrik 40 volt dengan lama kejutan 1 ms dan frekuensi kejutan 4 kali.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efisiensi transfer gen menggunakan metode elektroporasi sperma ikan mas pada tegangan 40 volt dengan lama kejutan 1 ms dan frekuensi kejutan 4 kali.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 1992 **Dictionary of Science and Technology**, Academic Press
- _____. 2009. **Pulse Agile® Electroporation**. Cyto pulse sciences, Inc.
- _____. 2006. Gene Pulser Xcell Electroporation system. Instruction manual. BIORAD
- Andreason, GL, Evans, GA, **Optimization of electroporation for transfection of mammalian cells** 1989, Anal. Biochem. 180:269-275
- Andreason GL, Evans GA .1988. **Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation**. Biotechniques 6:650–660.
- Alberts, Bruce. 2010. **Molecular Biology of The Cells**. Garland publishing . 1650 halaman
- Amann RP, Graham JK. 1992. **Spermatozoal Function**. In: Mckinnon AO, Vos JL (eds)., Equine Reproduction. Philadelphia: Williams and Wilkins. 715-745
- Andree .F.M, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Golzio, M. Cemazar, N pavscl, M. P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumman, J. Teissie dan L. M.Mir. 2008. **Efficiency of High and Low Voltage Pulse Combination for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor and skin**. Human Gene Therapy. Nov 2008, Vol. 19, No. 11: 1261-1272
- Arie, Usni. 2008. **Budidaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L)**. <http://solusiikanmas.blogspot.com>
- Bailey JL, Buhr MM. 1994. **Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa**. *Can J Anim Sci* 74:45-51.
- Bedore AG. 1999. **Characterization and conservation of pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) and piraicanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen [in Portuguese]**. Belo Horizonte, Brazil: Federal University of Minas Gerais. MSc Thesis
- Billard R. 1978. **Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities** *Aquaculture* 14: 187 - 198.
- Billard R. & Cosson M.P.1992 **Some problems related to the assesement of sperm motility in freshwater fish**. *Journal of Experimental Zoology* 261, 122-131
- Billard R., Cosson J., Crim L.W. and Suquet M. 1996 **Sperm physiology and quality**. In: **Broodstock management and egg and larval quality** (ed. by

N.R. Bromage & R.J. Roberts), pp.53-76, Cambridge University Press, Cambridge

Cambeyron dan Zohar, 1990. **A Diluent for Sperm Cryopreservation of Gilthead Sea Bram *Sparus aurata***. Aquaculture 90. P 345-352

Chan, Anthony W.S. **1999. Transgenic Animals: Current and Alternative Strategies**. Oregon Regional Primate Research Center, Oregon Health Sciences University, Beaverton, Oregon. Volume: 1 Issue 1: July 5, 2004 pp. 25-46

Chen TT, Right K, Lin CM, Powers DA, Hayat M, Chatakondi N, Ramboux AC, Duncan PL, Dunham RA. 1993. **Expression and inheritance of RSVLTR-rtGHI complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio***. Molecular Marine Biology and Biotechnology 2, 88-95.

Chen, T.T , Chiou, Pinwen, P., Khoo, J., Chun, C.Z.,. 2005 **Transgenic fish. In "Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine"** . (Meyer, R.A. ed) Vol. 14, 2nd edition, pp. 473–503. Wiley-VCH, KgA, Weinheim.

Chen, Hsin-Liang, Hong-Shii Yang , Rang Huang and Huai-Jen Tsai. 2006. **Transfer of a foreign gene to Japanese abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) by direct testis-injection**. Aquaculture 253 . 249–258

Collares .Tiago, Vinicius Farias Campos, Fabiana Kommling Seixas, Paulo V Cavalcani, Odira Dellagostin, Heden Luiz M Moreira and Joao carlos Deschamps . 2010. **Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer**. Biotechnology Center, Federal University of Pelotas, University Campus, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

Dan Yu and Zhang Peijun. 2005. **A sperm-mediated GFP gene transfer in amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaoense*)**. *Chinese Science Bulletin* 2005 Vol. 50 No. 4 380 382

Effendy, M.I. 1997. **Biologi Perikanan**. Yayasan Nusatama. Bogor. 112 hal

Fairfox. 2008. **Design Donor (Know Donor)**
<http://www.fairfaxcryobank.com/DesignatedDonor.aspx>

Fromm, M.E., L.P. Taylor, and V. Walbot. 1985.**Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electrophoration**. Proc Natl Acad Sci USA 882: pp 5824-5828

Fujaya, Yushinta. 2004. **Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan**. Rineka cipta. Jakarta .179 halaman

Gagne. M.B., F. Pother dan M.A. Sirard. 1991. **Effect of microinjection in in vitro matured bovine oocytes on in vitro development of embryos.** Biol of reproduction 44 : 76.

Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. **Spermatozoa and Seminal Plasma.** In : B. Hafez/ E.S.E. Hafez (eds.). Reproduction in Farm Animal. 7th Ed. Lippicott Williama & Wilkins. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aries. Hong Kong, Sydney, Tokyo. pp : 96 – 109.

Gazperz, V. 1991. **Metode Perancangan Percobaan.** CV. Armico. Bandung. 472 halaman

Giese, Arthur C. 1979. **Cell Physiology.** W. B Saunders Company. Toppan company. Tokyo. Japan. 609 halaman

Ginzburg. A. s., 1972. **Fertilization In Fish and Problem Of Polyspermy.** Keter Press, Ferusalem. Halaman 87-145

Golzio, M P Mora, C Raynaud, C Delteil, J Teissié, and M P Rols. 1998. **Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells.** Biophys J. June; 74(6): 3015–3022.

Golzio M, Teissie J, Rols MP. **Direct Visualization At the Single-Cell Level Of Electrically Mediated Gene Delivery.** 2002, Proc Natl Acad Sci U S A. Feb 5;99(3):1292-1297.

Gordon I. 1994. **Laboratory Production of cattle embryos.** Cab International Walingford.. 518 halaman

Hongbao Ma dan Guozhong Chen. 2005. **Gene Transfer Technique.** Michigan State University, East Lansing, MI 48823, USA. Nature and Science. 2005;3(1):25-31

Gusrina. 2008. **Budidaya Ikan Jilid 1 untuk SMK.** Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan, Direktorat Jenderal Manajemen Pendidikan Dasar dan Menengah, Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta

Hafez, E.S.E. 2000. **Presevation and Cry Presevation of Gametes and Embryos.** In : B. Hafez/ E.S.E. Hafez (eds.). Reproduction in Farm Animal. 7th Ed. Lippicott Williama & Wilkins. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aries. Hong Kong, Sydney, Tokyo. pp : 431 – 442.

Handarini, Ristika. 2004. **Produksi Ternak Transgenik Sebagai Upaya Peningkatan Mutu Genetik Ternak.** Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara. 17 halaman

Hardjamulia, A. 1979. **Budiadaya Perikanan. Budiadaya Iakan Mas (*Cyprinus carpio L*), Ikan Tawes (*Puntius javanicus*), dan Ikan Nilem (*Oeteochllus***

hasselti. SUPM Bogor. Badan Pendidikan, Latihan pertanian dan Penyuluhan Pertanian. Departemen Pertanian. Halaman 1-7

Harvey, B. J dan W. S Hoar. 1979.. **The Theory And Practice of Induced Breeding In fish.** IDRC-2le. Ottawa. Halaman 55-69.

Hayt, 1974, **Engineering Electro-Magnetics**, McGraw Hill. 66 halaman

Haubruge E, Petit F, Gage M, 2000. **Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol.** *Proc. R. Soc. Biol. Ser. B.* 267: 2333 -2337

Herman,. 2009. **Perakitan Tanaman Tahan Serangga Hama Melalui Rekayasa Genetik.** Bulletin Agrobio Vol 5 No 1 halaman 1-13

Hidayaturahmah. 2007. **WAKTU MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L) PADA BEBERAPA KONSENTRASI LARUTAN FRUKTOSA.** BIOSCIENTIAE Volume 4, Nomor 1, Januari 2007, Halaman 9-18. <http://www.unlam.ac.id/bioscientiae/>

Hoar , W.S., D. J. Randall. Dan E.M. Donaldson. 1983. **Fish Physiologi:** Volume IX, Reproduction, part B, Behavior and Fertility Control. Academy Press. 477 halaman

Jim, H. 2008. **DNA Vaccine Delivery Program At NCI.** Frederick County Biote. <http://fredcobio.wordpress.com/2008/03/18/dna-vaccine-deliveryprogram-at->

Jeyendran RS, Zaneveld LJD. 1986. **Instruction influences for Hypoosmotic Swelling (HOS) Test.** Short Course Reproduction / Andrology and Non Hormonal contraception. Chicago

Kang, H. J, Goro Yoshizaki, Osamu Homma, Charlos, A., Strusman, Fumio Takasima. 1999. **Effect of Osmotic Differential on the Efficiency of Gene Transfer by Electroporation Fish Spermatozoa.** Aquaculture 173. page 297-307

Kartasudjana, Ruhyat 2001. **Teknik Inseminasi Buatan Pada Ternak.** Departemen Pendidikan Nasional Proyek Pengembangan Sistem Dan Standar. Pengelolaan SMK Direktorat Pendidikan Menengah Kejuruan. Jakarta. 44 halaman

Kazakov., R. 1981. **The Effect Of the Size Atlantic Salmon *Salmon salar* L, eggs on Embrios and Allevin.** J Fish Biol 19: 353-360

Khairuman, SP, Ir. Dodi Sudenda, MM, & Ir. Bambang Gunadi, M.Sc. 2008. **Budi Daya Ikan Mas Secara Intensif.** AgroMedia Pustaka. Jakarta. 156 halman

- Kurita, Kayoko, Shawn M. Burgess, Noriyoshi Sakai. 2003. **Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of *in vitro*-cultured sperm**. Edited by Ryuzo Yanagimachi, University of Hawaii, Honolulu, *PNAS* February 3, 2004 vol. 101 no. 5 pp. 1263-1267
- Kurokura H, Hirano R, Tomita M, Iwahashi M.1984. **Cryopresevation of carp sperm**. *Aquac Res.* 31:245-258.
- Khoo HW, Ang LH, Lim HB, Wong KY. 1992. **Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA in to Zebrafish**. *Aquaculture* 107, 1-19
- Kruger, J.C. D.W., G.L. Smit, J.H.J. Van Vuren and J.T. Ferriera. 1979. **Some Chemical and Physical Characteristics of the Semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus***. *J. Fish. Biol.* 24 : 263 – 272
- Lagler, K. 1972. **Freshwater fishery biology**. Brown Company, Iowa., p. 417.
- Liao, I. C. 2000. **Aquaculture Development : Challenge for The 21st Century** Taiwan Fisheries Research Institute. Taiwan. 18 p
- Lu, J.K., Fu, B.H., Wu, J.L., Chen, T.T. 2002. **Production of transgenic silver sea bream (*Sparus Sarba*) by different gene transfer methods**. *Mar Biotechnol* 4, 328–337.
- Marawali Aloysius, Thomas mata hine, Burhanuddin, dan H.L.L belli. 2001. **Dasar-dasar Ilmu Reproduksi Ternak**. Departemen pendidikan nasional. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Badan Kerjasama Perguruan Tinggi Negeri. Indonesia Timur. Kupang.
- Maria. A.N., A.T.M. Viveiros¹, L.H. Orfão, A.V. Oliveira, G.F. Moraes . 2006. **Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piraicanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae)**. Animal Sciences Department, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil
- Masrizal dan Efrizal. 1997. **Pengaruh Rasio Pengenceran Mani terhadap Fertlisasi Sperma dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)**. *Fisheries Journal Garing* 6: 1-9.
- Moeloek, dr. Nukman. **Analisis Semen Manusia**. Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Halaman 51-58
- Moyer, LS, 1936. **A suggested standard method for the investigation of electrophoresis**, *J Bacteriology*, 31(5):531-546
- Moghadam KK, R. Nett, JC. Robins, MA. Thomas, SG. Awadalla, MD. Scheiber, and DB.Williams 2005. **The motility of epididymal or testicular**

- spermatozoa does not directly affect IVF/ICSI pregnancy outcomes.** J. Androl. 26(5): 619-623.
- Murtidjo. 2001. **Beberapa Metode Pembenihan Ikan Air Tawar.** Kanisius. Yogyakarta. 108 halaman
- Muller F, Ivies Z, Erdelyi F, Papp T, Varadi L, Horvath L, Maclean N, Orban L. 1992. **Introducing foreign genes into fish eggs by electroporated sperm as a carrier.** *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1, 276-281.
- Nazir. 2002. **Metode Penelitian Cetakan III.** Ghalia Indonesia. Jakarta. Halaman 25-28
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofscneider PH (1982). **Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.** EMBO J 1, 841-5.
- Neumann, E, Rosenheck, K. 1972. **Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes,** J Membr. Biol 10, 279-290
- Nickoloff JA. 1995. **Preface.** In: Nickoloff JA, editor. **Electroporation Protocols for Microorganisms.** Totowa, New Jersey: Humana Press. p v-vi.
- Nikoletos N, Kupker W, Demirel C, Schopper B, Blasing G, Sturm R, Felberbaum R, Bauer O, Diedrich K, Al-Hasani S. 1999. **Fertilization Potential of spermatozoa with abnormal morphology.** Hum reprod;14(suppl.1) : 47-70
- Nurman. 1998. **Pengaruh penyuntikan Ovaprim terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell).** *Fisheries Journal Garing* 7: 34-42 .
- Oko RJ, Kazemie M. 1998. **The Biochemistry of The Sperm Inner Acrosomal Membrane and Its Relevance to fertilization.** Proc 20 th. Annual Work Shop Canada West Society reprod boill 1998; abstr 9
- Paisal .2008. **Pemeriksaan Sperma.** 07 september 2008. <http://www.wartamedika.com/2008/09/pemeriksaan-sperma.html>
- Partodihardjo, S. 1987. **Ilmu Reproduksi Hewan.** Mutiara Sumber Widya, Jakarta. 558 halaman
- Ploudy , M. G dan Bilard. R 1983. **The Chemical composition Of Companion Fluids of The Gametes In The Common Carp (*Cyprinus Carpio* L).** Proceeding the International symposium On Reproductive Physiology in Fish. Center of Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. Netherland. 134 Halaman

- Potter, H., Weir, L., Leder, P. (1984) **Enhancer-dependent expression of human *k* immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.** Proc Natl Acad Sci USA 81, 7161–7165.
- Powers, D.A., Herford, L., Cole, T., Creech, K., Chen, T.T., Lin, C.M., Kight, K., Dunham, R.A. 1992 **Electroporation: a method for transferring genes into gametes of zebrafish (*Brachydanioerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and common carp (*Cyprinus carpio*).** Mol Mar Biol Biotechnol 1, 301–308.
- Purves WK. 2001. **Life: The Science of Biology- 6th ed.** Sinauer Associates, pp.316-317.
- Robertis ED, Robertis EM. 1979. **Cell and Molecular Biology.** Philadelphia: Saydesr College.
- Rustidja. 1985.. **Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan.** Fisheries Project Unibraw. Malang.
- Rustidja. 1996. **Gynogenesis Meiosis.** Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. 51 halaman
- Rustidja. 1999. **Pemisahan spermatozoa X dan Y Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*).** Fakultas Perikanan . Universitas Brawijaya. Malang. 76 Halaman
- Rustidja. 2000. **Prospek Pembekuan Sperma.** Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 68 halaman
- Saanin, H. 1984. **Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan.** Bina Cipta. Bandung. 40 halaman
- Sa'diyah, H. 2009. **Rancangan Faktorial.** <http://elearning.unej.ac.id/courses/>
- Sahri, M. 1992. **Diklat Kuliah Dasar-Dasar Metode Penelitian dan Rancangan Perobaan.** LUW/UIBRAW FISH. Fisheries Project. Malang
- Scot, A..P. and Baynes S.M. 1980. **A Review of the Biology, Handling and Storage of Salmonid Spermatozoa.** Journal of Fish Biology 17, 707-739.
- Samarfilk, Aliye. 2002. **Application of Gene Transfer Technology for Genetic Improvement of fish.** University of Çanakkale Onsekiz Mart, Aquaculture College, 17100. 6 halaman
- Setiadi, M. A, Suprayogi, A. Yulnawati. , 2006. **Viabilitas Dan Integritas Plasma Spermatozoa Epididimis anjing elama Penyimpanan Pada Pengencer Yang Berbeda.** Media Kedokteran Hewan. Volume 22 No. 2 Mei 2006 halaman 118-123



Shigekawa, K., Dower, W.J. 1988. **Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to introduction of macromolecules into cells.** *Biotechniques* 6, 742–751.

Shimogori T, Ogawa M (2008). Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain. *Dev Growth Differ* 50, 499–506.

Sin, F.Y., Walker, S.P., Symonds, J.E., Mukherjee, U.K., Khoo, J.G., Sin, I.L. 2000 **Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability and fate of transgene.** *Mol Reprod Dev* 56 (Suppl. 2), 285–288

Sin. F.Y.T, walker, S.P, Symonds J.E, Sin I.L. 2008. **Sperm Mediated Gene Transfer In Chinook Salmon.** <http://www.heb.pac.dfo.mpo.gc.ca>

Sin , F.Y.T, Mukherjee. U. .K McKenzie, J. C, Sin. I. L. 2006. **Electroporation of Abalone Sperm Enhances Sperm-DNA Association.** *Journal of Fish Biology* Volume 47 Issue sA, Pages 20 – 28

Soehartojo. H, Hardjopranjoto.1995. **Ilmu Kemahiran Pada Ternak.** Airlangga University Press. Surabaya. 330 halaman

Soeparna. 1980. **Pengantar Spermatologi,** Masalah Khusus. Fakultas Perikanan. IPB. Bogor

Stoss , J., dan Donaldson , E. M., 1982. **preservation On Fish Gametes. Proceeding the International symposium On Reroductive Physiolgy in Fish.** Center of Agricultural Pubhling and Documentation. Wageningen. Netherland. Halaman 114-120

Stoss J. 1983. **Fish gamete preservation and spermatozoan physiology.** *In:* Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds.). *Fish physiology.* New York, NY: Academic Press. vol. IXB, pp.305–350.

Sucipto. 2008. **Pengembangan Ikan transgenic (sebuah Pengantar).** <http://naksara.net/aquaculture/Gnetic/pengembangan-ikan-transgenik-sebuah-pengantar.html>

Symonds JE, Walker SP, Sin FYT. 1994 **Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA: Evidence of enhanced sperm /DNA association.** *Aquaculture* 119, 313-327

Sudenda. S, Khairuman, Ruminah, Jubaedahn N .D. 2005. **Petunjuk Teknis Pembenihan Ikan Patin, Mas dan Lele.** Balai pengembangan budidaya perikanan air tawar (BPBPAT). Jawa barat. 88 halaman

Sumantadinata, K 1981. **Pengembangbiakan Ikan-Ikan Peliharaan di Indonesia.** Sastra Hudaya . Jakarta. Halaman 1-105

Sumantadinata, K 1993. **Teknologi Produksi Benih Unggul Ikan Mas (*Cyprinus Carpio L*) Fenotipe Generasi Pertama Beberapa Strain Ikan Mas Hasil Pemurnian dengan Metode Gynogenesis**. IPB. Bogor. Halaman 1-10

Susanto. 1987. **Budidaya Ikan Lele**. Kanisius. Yogyakarta. 71 halaman

Taghyr.2008. **Pengertian Hambatan, Arus, Tegangan dan Bunyi Hukum Ohm**.
<http://taghyr.owrdpress.com/2008/08/20>

Tang , M. U dan R. Affadi. 2001. **Biologi Reproduksi Ikan**. P2KP2 unri. Riau. 165 halaman.

Toelihere. R. Mozes 1981. **Inseminasi Buatan Pada Ternak**. Angkasa. Bandung. Halaman 1-22

Toelihere R. Mozes.1985.**Fisiologi Reproduksi Pada Ternak**, Penerbit Angkasa Bandung

Tsai, Huai Jen and Si Shen Li . 2000. **Transfer of Foreign Gene To Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by spermatophore-Microinjection**. Molecular Reproduction and Development 56:149-154(2000)

Weaver, JC, Chizmadzhev, Y, **Theory of Electroporation, a review**. 1996 Bioelectrochem. Bioenerg. 41:141-152

Weitze KF, Petzoldt R. 1992. Preservation of semen. *Anim Reprod Sci* 28:229-235.

Woynarovich, E dan L. Horvath .1980. **The Artificial Propagation of Warm Water Fin fish- A manual Of Extension**. FAO. Fisheries Technical Paper. No 201. Rome. 1- 183

Yahya, Harun. 2002. **Menyingkap Rahasia Alam semesta**. Dzikra. Bandung. Halaman 45-54

Yu I, and SP. Leibo SP. 2002. **Recovery motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C**. Theriogenology57(3) : 1179-1190.

Yustina, Arnetis dan Darmawati.**Daya Tetas dan Laju Pertumbuhan Larva Ikan Hias *Betta splendens* di Habitat Buatan**. Jurnal Natur Indonesia 5(2): 129-132 (2003) ISSN 1410-9379

Zhanggischan, Zuhul M.Sc. EE. 2004. **Prinsip Dasar Elektroteknik**. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. 748 halaman

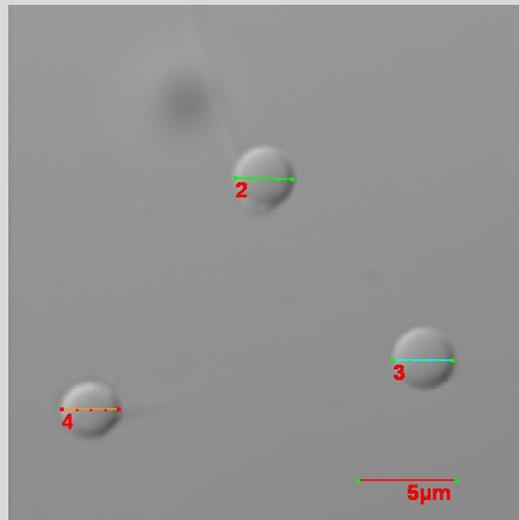
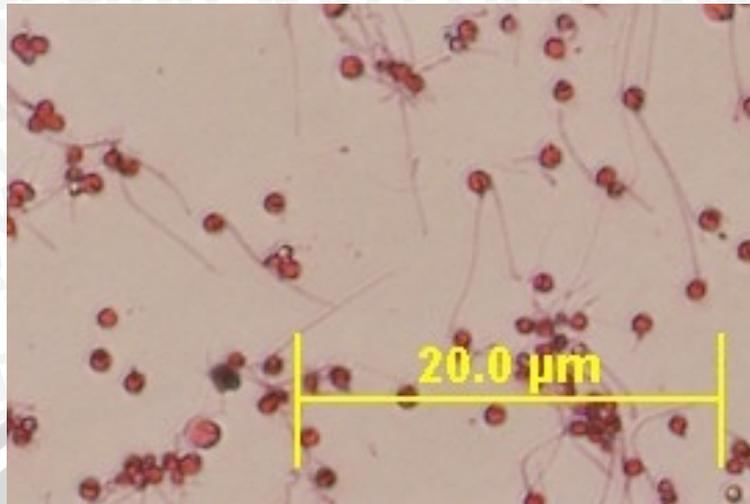
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



Lampiran 1. Gambar sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) perbesaran 400 x



Ukuran sperma

- Diameter kepala = $\pm 3 \mu\text{m}$
- Panjang ekor = $\pm 7 \mu\text{m}$
- Panjang total sperma = $\pm 10 \mu\text{m}$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



Lampiran 2. Konsentrasi Sperma Ikan Mas

Sperma diencerkan 100 kali dengan volume sperma 10 μ l dan Volume Na Fis 990 μ l. Dari pengamatan 5 lapang pandang pada haemocytometer didapatkan jumlah sperma

$$I = 25$$

$$II = 31$$

$$II = 34$$

$$IV = 34$$

$$V = 32$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi sperma} &= \frac{25 + 31 + 34 + 34 + 32}{5} \times 16 \times 10^4 \times 10^2 \\ &= \frac{156}{5} \times 16 \times 10^4 \times 10^2 \\ &= 499,2 \times 10^4 \times 10^2 \\ &= 499,2 \times 10^6 \\ &= 4,9 \times 10^8 \text{ sel/ml} \end{aligned}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



Lampiran 5. Analisa Data Hasil Penelitian

A. Persentase motilitas sperma ikan mas setelah elektroporasi

Perlakuan		Ulangan			Total	Rata-rata
Lama kejutan	Frekuensi kejutan	1	2	3		
0,5 ms (a1)	2 kali (B1)	60	50	40	150	50
	4 kali (B2)	60	70	50	180	60
	6 kali (B3)	40	45	50	135	45
1 ms (a2)	2 kali(B)	65	65	50	180	60
	4 kali(B2)	75	70	60	205	68,33
	6 kali(B3)	70	70	60	200	66,67
Total	-	-	-	-	1050	-

Perhitungan JK (jumlah Kuadrat)

$$\begin{aligned}
 & - \text{Faktor Koreksi (FK)} && = 1050^2/18 \\
 & && = 1102500/18 \\
 & && = 61250 \\
 & - \text{JK total} && = (60^2 + 50^2 + \dots + 60^2) - 61250 \\
 & && = 23550 + 23450 + 18800 \\
 & && = 65800 - 61250 \\
 & && = 4550 \\
 & - \text{JK Perlakuan kombinasi} && = \frac{(150^2 + 180^2 + \dots + 200^2)}{3} - 61250 \\
 & && = 62516,67 - 61250 \\
 & && = 1266,67
 \end{aligned}$$

Perlakuan kombinasi ini dapat dipecah menjadi 3, yaitu :

- Pengaruh perlakuan faktor I
- Pengaruh perlakuan faktor II
- Pengaruh perlakuan faktor I dan II

Untuk itu dilihat tabel faktor perlakuan I dan II sebagai berikut

Lampiran 5. (lanjutan)

Lama kejutan	Frekuensi kejutan			Total	Rata-rata
	2 (B1)	4 (B2)	6 (B3)		
0,5 ms (A1)	150	180	135	465	155
1 ms (A2)	180	205	200	585	195
Total	330	385	335	1050	-
Rata-rata	165	192,5	167,5	-	-

Sehingga

- JK lama kejutan = $\frac{465^2 + 585^2}{3 \times 3} - 61250$
 $= 62050 - 61250$
 $= 800$
- JK Frekuensi Kejutan = $\frac{330^2 + 385^2 + 335^2}{2 \times 3} - 61250$
 $= 61558,33 - 61250$
 $= 308,8$
- JK interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan = JK perlakuan kombinasi
 – JK lama kejutan - JK frekuensi kejutan
 $= 1266,67 - 800 - 308,8$
 $= 157,87$
- JK acak = JK total – JK perlakuan kombinasi
 $= 4550 - 1266,67$
 $= 328,33$

Tabel sidik ragam

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. perlakuan kombinasi	5	1266,67	253,33	9,26	-	-
a. lama kejutan	1	800	800	29,26**	4,75	9,33
b. frekuensi kejutan	2	308,8	154,4	5,64*	3,89	6,93
c. interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan	2	157,87	78,93	2,88 ^{ns}	3,89	6,93
2. Acak	12	328,33	27,34	-		
Total	17					

Uji BNT lama kejutan

$$SED = \sqrt{\frac{2KT \text{ acak}}{r * 2}} = \sqrt{\frac{2 * 27,34}{3 * 2}}$$

$$= 3,01$$

$$BNT 5\% = t \text{ tabel } 5\% (\text{db acak}) * SED$$

$$= 2,179 * 3,01$$

$$= 6,55$$

$$BNT 1\% = t \text{ tabel } 1\% (\text{db acak}) * SED$$

$$= 3,055 * 3,01$$

$$= 9,19$$

Tabel uji BNT lama kejutan

Rata-rata lama kejutan	0,5 ms=155	1 ms=195	notasi
0,5 ms=155	-	-	a
1 ms=195	40**	-	b

Uji BNT frekuensi

$$SED = \sqrt{\frac{2KT \text{ acak}}{r * 3}} = \sqrt{\frac{2 * 27,34}{3 * 3}}$$

$$= 2,46$$

$$BNT 5\% = t \text{ tabel } 5\% (\text{db acak}) * SED$$

$$= 2,179 * 2,46$$

$$= 5,36$$

$$BNT 1\% = t \text{ tabel } 1\% (\text{db acak}) * SED$$

$$= 3,055 * 2,46$$

$$= 7,51$$

Tabel Uji BNT frekuensi

Rata-rata frekuensi	2=330	6=335	4=385	Notasi
2=330	-	-	-	a
6=335	5 ^{ns}	-	-	a
4=385	55**	50**	-	b



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



Lampiran 5. (lanjutan)

C. persentase daya fertilitas sperma ikan mas setelah elektroporasi

Perlakuan		Ulangan			Total	Rata-rata
Lama kejutan	Frekuensi kejutan	1	2	3		
0,5 ms (A1)	2 kali (B1)	11.8	30	10	51,8	17,26R
	4 kali (B2)	49.09	19.09	40.9	108,27	36,09
	6 kali (B3)	23.63	64.54	15.45	103,62	93,32
1 ms (A2)	2 kali(B)	24.54	28.18	23.63	76,35	25,45
	4 kali(B2)	34.54	25.45	40	99,99	33,33
	6 klai(B3)	29.09	14.54	40.9	84,53	28,17
Total	-	-	-	-	524,56	-

Perhitungan JK (jumlah Kuadrat)

- Faktor Koreksi (FK) = $G^2/n = 524,56/2*3*3$
 $= 524,56^2/18$
 $= 275163,19 / 18$
 $= 15286,84$
- JK total = $(11.8^2 + 30^2 + + 40.9^2) - FK =$
 $= 16313,9 - 15286,84$
 $= 1026,96$
- JK Perlakuan kombinasi = $\frac{(51,8^2 + 108,27^2 + + 84,53^2)}{3} - FK = Q$
 $= 16014,32 - 15286,84$
 $= 727,48$

Perlakuan kombinasi ini dapat dipecah menjadi 3, yaitu :

- a. Pengaruh perlakuan faktor I
- b. Pengaruh perlakuan faktor II
- c. Pengaruh perlakuan faktor I dan II

Untuk itu dilihat tabel faktor perlakuan I dan II sebagai berikut :

Lampiran 5. (lanjutan)

Lama kejutan	Frekuensi kejutan			Total	Rata-rata
	2	4	6		
0,5 ms A1	51,8	108,27	103,62	263,69	87,89
1 ms A2	76,35	99,99	84,53	260,87	86,95
Total	128,15	208,26	188,15	524,56	-
Rata-rata	64,07	104,13	94,07	-	-

Sehingga

- JK lama kejutan = $\frac{263,69^2 + 260,87^2}{3 \times 3} - FK$
= 15287,28 - 15286,84
= 0,44
- JK Frekuensi Kejutan = $\frac{128,15^2 + 208,26^2 + 188,15^2}{2 \times 3} - FK$
= 15865,84 - 15286,84
= 579,005
- JK interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutaan = JK perlakuan kombinasi – JK lama kejutan - JK frekuensi kejutan =
= 727,48 - 0,44 - 579,005
= 148,035
- JK acak = JK total – JK perlakuan kombinasi
= 1026,96 - 727,48
= 299,48

Tabel sidik ragam

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. perlakuan kombinasi	5	727,48	145,496	-	-	-
a. lama kejutan	1	0,44	0,44	0,01 ^{ns}	4,75	9,33
b. frekuensi kejutan	2	579,005	289,025	11,58 ^{**}	3,89	6,93
c. interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan	2	148,035	74,01	2,96 ^{ns}	3,89	6,93
2. Acak	12	299,48	24,95	-	-	-
Total	17					

Uji BNT

$$SED = \sqrt{\frac{2KT \text{ acak}}{r * \text{levelperlakuan}}} = \sqrt{\frac{2 * 24,95}{3 * 3}}$$

$$= 2,35$$

BNT 5% = t tabel 5 % (db acak) * SED

$$= 2,179 * 2,35$$

$$= 5,13$$

BNT 1 % = t tabel 1 % (db acak) * SED

$$= 3,055 * 2,35$$

$$= 7,17$$

Tabel BNT untuk frekuensi kejutan

Rata-rata perlakuan	2=128,15	6=188,15	4=208,26	notasi
2=128,15	-	-	-	a
6=188,15	60**	-	-	b
4=208,26	88,11**	20,11**	-	b

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



Lampiran 5. (lanjutan)

D. Persentase daya tetas

Perlakuan		Ulangan			Total	Rata-rata
Lama kejutan	Frekuensi kejutan	1	2	3		
0,5 ms	2 kali	53,80	24,24	72,72	150,76	50,25
	4 kali	7,40	71,42	37,77	116,59	38,86
	6 kali	46,15	29,94	23,52	99,61	33,20
1 ms	2 kali	33,33	61,90	30,76	125,99	41,99
	4 kali	44,73	28,57	13,63	86,93	28,97
	6 kali	18,75	31,25	24,44	74,44	24,81
Total	-	-	-	-	654,32	-

Perhitungan JK (jumlah Kuadrat)

$$\begin{aligned}
 - \text{ Faktor Koreksi (FK)} &= G^2/n = G^2/2*3*3 = G^2/18 \\
 &= 654,32^2/18 \\
 &= 428134,66/18 \\
 &= 23785,25 \\
 - \text{ JK total} &= (53,80^2 + 24,24^2 + A2^2 + \dots + 24,44^2) - FK \\
 &= 29748,67 - 23785,25 \\
 &= 5963,42 \\
 - \text{ JK Perlakuan kombinasi} &= \frac{(150,76^2 + 116,59^2 + \dots + 74,44^2)}{3} - FK = Q \\
 &= 25071,85 - 23785,25 \\
 &= 1286,60
 \end{aligned}$$

Perlakuan kombinasi ini dapat dipecah menjadi 3, yaitu :

- Pengaruh perlakuan faktor I
- Pengaruh erlakuan faktor II
- Pengaruh perlakuan faktor I dan II

Untuk itu dilihat tabel faktor perlakuan I dan II sebagai berikut :

lampiran 5. (lanjutan)

Lama kejutan	Frekuensi kejutan			Total	Rata-rata
	2	4	6		
0,5 ms	150,76	116,59	99,61	366,96	122,32
1 ms	125,99	86,93	74,44	287,36	95,78
Total	276,75	203,52	174,05	654,32	-
Rata-rata	92,25	101,76	87,02	-	-

Sehingga

- JK lama kejutan = $\frac{366,96^2 + 287,36^2}{3 \times 3} - FK$
 $= 24137,26 - 23785,25$
 $= 352,01$
- JK Frekuensi Kejutan = $\frac{276,75^2 + 203,52^2 + 174,05^2}{3 \times 2} - FK$
 $= 24717,39 - 23785,25$
 $= 932,14$
- JK interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan = JK perlakuan kombinasi – JK lama kejutan - JK frekuensi kejutan =
 $= 1286,60 - 352,01 - 932,14$
 $= 2,45$
- JK acak = JK total – JK perlakuan kombinasi
 $= 5963,42 - 1286,60$
 $= 4676,82$

Tabel sidik ragam

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. perlakuan kombinasi	5	1286,60	257,32	0,66	-	-
a. lama kejutan	1	352,01	352,01	0,90 ^{ns}	4,75	9,33
b. frekuensi kejutan	2	932,14	466,07	1,19 [*]	3,89	6,93
c. interaksi lama kejutan dan frekuensi kejutan	2	2,45	1,225	3,14 ⁻⁰³ _{ns}	3,89	6,93
2. Acak	12	4676,82	389,735	-		
Total	17					

Uji BNT frekuensi

$$SED = \sqrt{\frac{2 KT acak}{r * level perlakuan}} = \sqrt{\frac{2 * 389,735}{3 * 3}}$$

$$= 9,30$$

BNT 5% = t tabel 5 % (db acak) * SED

$$= 2,179 * 9,30$$

$$= 20,2$$

BNT 1% = t tabel 1 % (db acak) * SED

$$= 3,055 * 9,30$$

$$= 28,41$$

Tabel BNT frekuensi

Rata-rata perlakuan	6=174,05	4=203,52	2=276,75	notasi
6=174,05	-	-	-	a
4=203,52	29,47**	-	-	b
2=276,75	102,7**	73,23**	-	b

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



Lampiran 7. Alat-alat penelitian



a. Satu set inkubator



b. Timbangan digital Metler PE 22



c. Timbangan digital AND EK 610



d. elektroporator



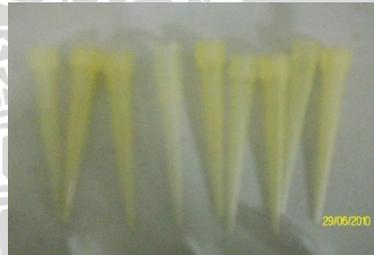
e. Mikroskop DIC



f. Mikropipet



g. Cuvette



h. Yellow tip



i. Blue tip



j. Ependorf

Lampiran 1. (lanjutan)



k. Haemocytometer



l. heater



m. Mikroskop



n. pH meter



o. Hand tally counter

Lampiran 8. Bahan penelitian



a. Ovaprim



b. Telur ikan



b. Na fisiologis



d. Hematoksilin eosin



e. Sperma ikan mas

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

