

**PENGARUH APLIKASI METODE EKSPONENSIAL DAN SQUARE WAVE
TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMA IKAN NILEM
(*Osteochilus hasselti*)**

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

Oleh :
**ANGGA WIRATAMA
NIM. 0610850008**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2010**

PENGARUH APLIKASI METODE EKSPONENSIAL DAN SQUARE WAVE
TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMA IKAN NILEM
(*Osteochilus hasselti*)

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

Oleh :

ANGGA WIRATAMA

0610850008

DOSEN PENGUJI I

(Prof. Ir. MARSOEDI, PhD)

NIP. 19460320 197303 1 001

TANGGAL :

DOSEN PENGUJI II

(BAMBANG SUSILO WIDODO)

NIP. 19500403 198303 1 002

TANGGAL :

MENYETUJUI,

DOSEN PEMBIMBING I

(Ir. ABDUL RAHEM FAQIH,MSi)

NIP. 19671010 199702 1 001

TANGGAL :

DOSEN PEMBIMBING II

(Ir. SOELISTYOWATI)

NIP. 19500424 197603 2 002

TANGGAL :

MENGETAHUI,

KETUA JURUSAN

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

TANGGAL :

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi yang berjudul "Pengaruh Aplikasi Metode Eksponensial Dan Square Wave Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)". Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi, pergerakan sperma dan kemampuan hidup sperma. ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan dan ilmu kelautan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan laporan ini dan keterbatasan yang dimiliki oleh penulis. Walau telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Laporan Skripsi ini dapat banyak berguna dan bermanfaat bagi pembaca pada umumnya serta bisa menjadi sumber informasi untuk penelitian berikutnya.

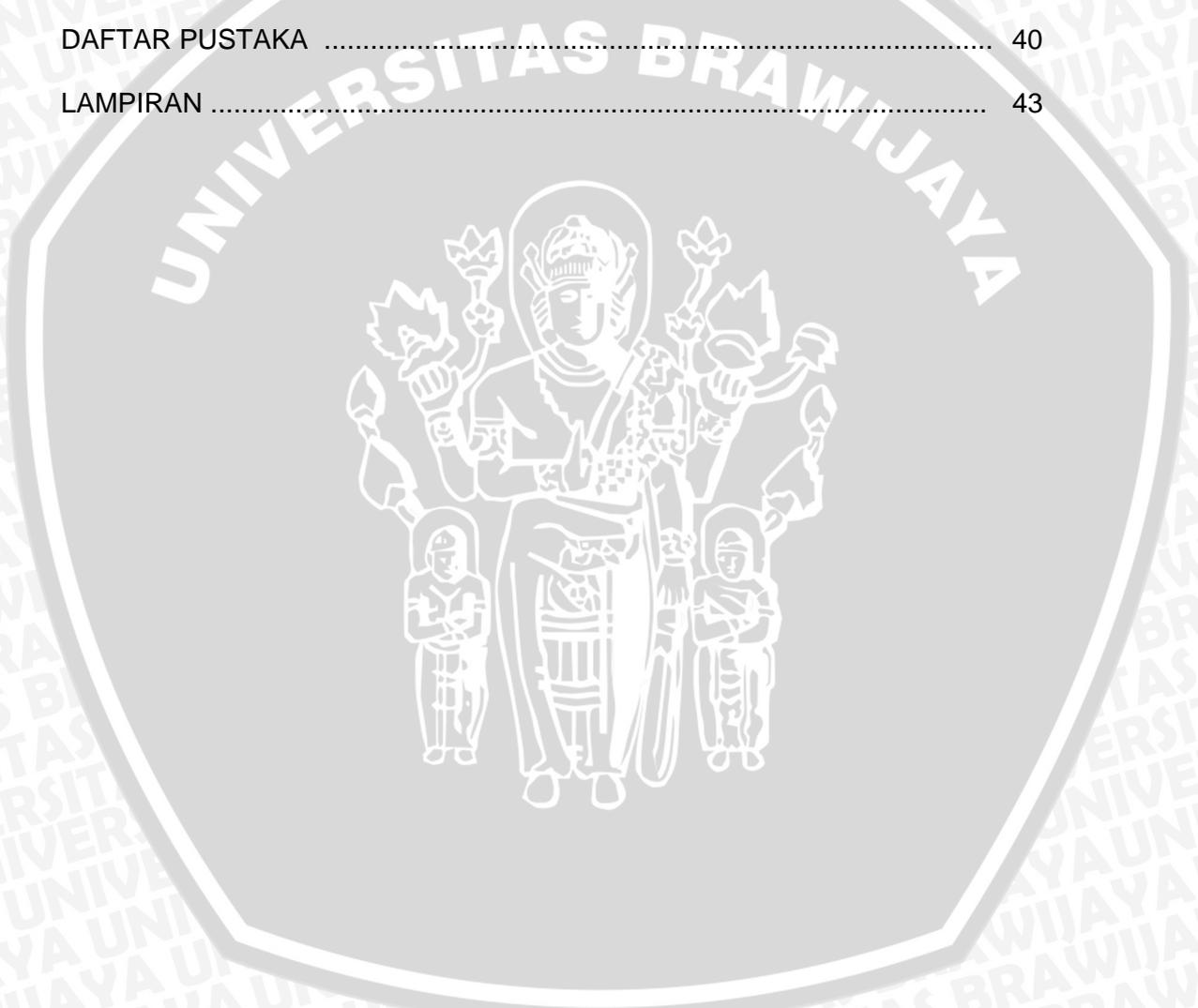
Malang, Oktober 2010

Penulis.

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesa	4
1.6 Tempat dan Waktu	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Biologi dan Morfologi	6
2.1.3 Ciri-ciri Ikan Nilem Jantan Matang Gonad	7
2.1.4 Ciri-ciri Ikan Nilem Betina Matang Gonad	7
2.2 Proses Spermatogenesis.....	7
2.2.1 Pengambilan Sperma Ikan Nilem.....	10
2.2.2 Stabilisasi Kondisi Sperma.....	11
2.2.3 Pergerakan dan Daya tahan hidup sperma.....	11
2.3 Efek Kejutan Listrik Terhadap Sel Sperma	13
2.4 Hubungan Motilitas dan Viabilitas Sperma	14
2.5 Metode Elektroporasi.....	15
2.6 Elektroporasi Sperma.....	19
2.7 Jeni-jenis Gelombang Terkait <i>Gene Pulser</i>	20
III. MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Materi Penelitian	21
3.1.1 Bahan	21
3.1.2 Alat	21
3.2 Metode Penelitian	22
3.3 Rancangan Penelitian	23
3.4 Prosedur Penelitian	25
3.5 Parameter Uji Penelitian	26
a. Motilitas Sperma.....	26
b. Viabilitas Sperma.....	27
3.6 Analisa Data	28

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Kualitas Sperma Kontrol.....	29
4.1.1 Motilitas Sperma.....	29
4.1.2 Viabilitas Sperma.....	32
4.2 Kualitas Sperma Elektroporasi	34
4.2.1 Metode Square Wave	35
4.2.2 Metode Eksponensial	36
4.2.3 Perbandingan Metode <i>Square Wave</i> dan <i>Eksponensial Wave</i>	37
V. KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	43



RINGKASAN

ANGGA WIRATAMA. Pengaruh Aplikasi Metode Eksponensial Dan Square Wave Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) (di bawah bimbingan **Ir. ABD. RAHEM FAQIH, MSi** dan **Ir. SOELISTYOWATI**).

Transfer gen pada ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) dengan menggunakan metode elektroporasi (Metode elektroporasi ada 2 yaitu metode Square Wave dan Eksponensial) dengan sperma ikan sebagai media transfer gen masih belum dilakukan di Indonesia. Sperma dapat digunakan sebagai media untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel telur. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh tegangan listrik dengan metode yang berbeda terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Breeding (Budidaya Perairan) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, mulai bulan Mei sampai Juni 2010. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode (*Square wave dan Eksponensial*) terhadap pergerakan (motilitas) dan kemampuan hidup (viabilitas) sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*).

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, sedangkan untuk analisa data digunakan adalah Uji t karena terdiri dari 2 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Sebagai perlakuan adalah metode Square wave dan eksponensial juga dilakukan 2 kontrol yaitu pengamatan sperma sebelum dan sesudah perlakuan. Parameter utama dalam penelitian ini adalah motilitas dan viabilitas sperma ikan nilem.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa elektroporasi dengan metode Square Wave lebih baik hasilnya jika dibandingkan dengan metode Eksponensial. Hal tersebut dapat dilihat pada nilai rata-rata motilitas sperma ikan nilem dengan menggunakan metode square wave sebesar 34%, sedangkan dengan metode eksponensial sebesar 11%. Demikian pula hasil nilai rata-rata viabilitas sperma ikan nilem dengan menggunakan metode Square Wave sebesar 56%, sedangkan dengan menggunakan metode Eksponensial sebesar 25%. Hasil pengamatan sperma sebelum elektroporasi diperoleh nilai motilitas sebesar 71,3% dan viabilitas sebesar 75%, sedangkan sesudah elektroporasi diperoleh nilai motilitas sebesar 46,6% dan viabilitas sebesar 52,6%.

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan bahwa sebaiknya elektroporasi menggunakan metode Square Wave agar diperoleh nilai motilitas dan viabilitas sperma yang tinggi dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang elektroporasi dengan metode Square Wave pada sel telur ikan.

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Elektroporasi merupakan proses penerapan medan listrik (pulsa) terhadap sel hidup dalam jangka waktu yang singkat. Elektroporasi memungkinkan pembentukan pori-pori sehingga molekul eksogen seperti DNA dapat masuk ke dalam sel. Elektroporasi merupakan teknik yang sangat efisien untuk memasukkan asam nukleat, protein, karbohidrat, pewarna, partikel virus dan molekul lain ke dalam berbagai macam sel seperti prokariotik dan eukariotik (Anonymous, 2010).

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

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

Modul PC dibutuhkan untuk elektroporasi tegangan tinggi. Modul PC digunakan untuk hambatan 50 ohms – 1000 ohms dalam setiap kenaikan 50 ohm. Modul ini

efektif untuk mengontrol konstannya waktu ketika digunakan hambatan tinggi, akan tetapi memiliki efek yang sedikit pada pengontrolan konstannya waktu ketika digunakan pada hambatan rendah.

Modul CE digunakan untuk elektroporasi sel eukariotik, termasuk sel mamalia dan protoplas tanaman. Sedangkan modul PC digunakan untuk elektroporasi bakteri dan jamur serta aplikasi lain dimana kejutan tegangan tinggi diterapkan pada sampel volume kecil dan ketahanan tinggi. Sistem Gene Pulser menghasilkan bentuk gelombang *eksponensial* dan persegi (square), memungkinkan untuk memilih gelombang yang terbaik untuk proses elektroporasi. Baik secara *eksponensial* maupun square telah digunakan dengan sangat efektif untuk elektroporasi. Bentuk gelombang elektroporasi dapat memiliki dampak yang signifikan terhadap efisiensi transformasi untuk tipe sel yang berbeda (Anonymous, 2010).

Transfer gen pada ikan dengan menggunakan metode elektroporasi dengan sperma ikan sebagai media transfer gen masih belum dilakukan di Indonesia. Padahal Kang *et al.* (1999) menyatakan bahwa sel sperma dapat digunakan sebagai media untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel telur. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh metode elektroporasi yang berbeda terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan.

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 *Exponential wave* telah digunakan dalam mentransfer gen ke dalam sperma ikan. Tegangan dari *Square wave* lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan yang mana untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol. Sedangkan *Exponential wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen atau berkelanjutan. Amplitudo itu sendiri adalah jarak terjauh simpangan dari titik

keseimbangan, akan tetapi dalam gelombang ini amplitudo tergantung pada tegangan yang diberikan (Muller *et al.*, 1992).

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

Sebagai media transfer gen, sperma sangat potensi dikembangkan dalam transgenik ikan karena prosedurnya yang relatif alami dan lebih efisien (Sin *et al.*, 2008). Kemudian Lavitrano *et al.* (2006) menyatakan sperma memiliki kelebihan sebagai media transfer gen, karena dalam proses transfer materi genetik, sperma sebagai vektor yang relatif alami. Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen pada ikan mas, lele dan nila (Muller *et al.*, 1992).

1.2 Perumusan Masalah

Dalam usaha budidaya ikan, pemijahan sebagai sebuah kegiatan yang sangat penting. Dalam pemijahan, sperma dari ikan jantan sangat menentukan tinggi rendahnya pembuahan. Kualitas sperma salah satunya dapat ditentukan dari tingkat motilitas dan viabilitas sperma itu sendiri. Transfer gen pada ikan dengan menggunakan metode elektroporasi dengan sperma ikan sebagai media transfer gen masih belum banyak dilakukan di Indonesia. Metode elektroporasi ada 2 macam yaitu metode Eksponensial dan Square Wave.

Berdasarkan hal-hal tersebut maka timbul beberapa pertanyaan, yaitu:

- ✓ Apakah Metode eksponensial dan square wave dapat mempengaruhi tingkat motilitas dan viabilitas sperma?
- ✓ Dari kedua metode tersebut mana yang lebih baik pengaruhnya terhadap motilitas dan viabilitas sperma?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kejutan listrik dengan metode yang berbeda (*Square wave* dan *Eksponensial*) terhadap pergerakan (motilitas) dan kemampuan hidup (viabilitas) sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*).

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dasar bagi pengembangan metode transgenik ikan Nilem.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*).

H_1 : Diduga pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda berpengaruh terhadap motilitas maupun viabilitas sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*).

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan (Laboratorium *Breeding*) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, mulai bulan Mei sampai Juni 2010.

II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Nilem

2.1.1 Klasifikasi Ikan Nilem

Ikan nilem (Gambar 1) kini banyak tersebar di pulau Jawa, Sumatra, Kalimantan dan Sulawesi dahulu diperkirakan mula-mula didomestikasi (dijinakkan) di Jawa Barat. Pusat-pusat pemijahan atau budidaya ikan sudah berhasil dilakukan oleh petani ikan antara lain terdapat di Kecamatan Tarogong Kabupaten Garut (Soeseno, 1978).



Gambar 1. Ikan Nilem (Anonymous, 2010)

Adapun klasifikasi Ikan Nilem menurut Djajadiredja (1990) adalah sebagai berikut:

- Phyllum : Cordata
- Kelas : Pisces
- Subkelas : Teleostei
- Ordo : Ostariophysi
- Subordo : Cyprinoidea
- Family : Cyprinoidea
- Genus : *Osteochilus*
- Spesies : *Osteochilus hasselti*

2.1.2 Biologi dan Morfologi ikan Nilem

Ikan nilem atau Silver Shark minnow termasuk familia Cyprinidae, genus *Osteochilus*, spesies *Osteochilus hasselti* mempunyai ciri morfologi antara lain mempunyai 12-18,5 jari-jari bercabang pada sirip punggung, bibir tertutup oleh lipatan kulit, mempunyai 5,5 sisik di antara sirip punggung pertama dengan linea lateralis, mempunyai bulatan warna hitam pada pangkal ekornya (Makmur, 2008).

Ikan nilem memiliki dua pasang sungut peraba yang terdapat pada mulutnya, bentuk mulut relatif lebar dengan mulut yang berkerut-kerut sebagai tanda pemakan jasad-jasad penempel. Warna dari ikan nilem coklat atau hijau kemerahan dan merah (Murtidjo, 1980).

Tubuh ikan nilem mirip dengan ikan mas, namun kepalanya kecil, badan agak panjang dan pipih dengan sirip punggung yang relative panjang. Badan ekor dikelilingi oleh 16-17 sisik, moncong tidak berlubang, letak mata agak ke atas, dan tinggi punggung hampir sama dengan tinggi batang ekor (Anonymous, 2007).

Ikan ini dapat hidup di hampir semua jenis lingkungan perairan, namun ikan ini lebih senang hidup di air yang deras, dengan substrat yang sedikit berpasir. Bermigrasi dari arus sungai yang meluap-luap ke daerah yang berarus rendah hingga ke periode dari arus deras tersebut berangsur-angsur kembali ke arus deras biasa yang lebih disukai oleh ikan nilem tersebut. Juvenil pertama kali dapat terlihat pada minggu-minggu pertama bulan Agustus. Dan akan kembali ke perairan yang memiliki aliran air deras seperti pada habitas semulanya dengan berlindung pada akar-akar tanaman ataupun pada benda keras lainnya (Torres, 2009)

2.1.3 Ciri-ciri Ikan Nilem Jantan Matang Gonad

Ikan nilem termasuk ikan yang produktif karena bisa dipijahkan 3-4 kali dalam setahun. Keberhasilan pemijahan sangat ditentukan pada faktor induk dan pengaturan lingkungan pemijahan. Untuk itu, pemilihan induk ikan nilem yang hendak dipijahkan harus memenuhi persyaratan sebagai berikut: perutnya mengembang dan terasa empuk ketika diraba. berumur 8 bulan berat badan sekitar 100 g, bila dipijat perut ke arah alat genital, induk jantan akan mengeluarkan cairan seperti susu (Anonymous, 2008).

Induk ikan Nilem jantan mempunyai kepadatan sel sperma sebesar 26,45 juta perml ($2,6 \times 10^7$ sel/ml). Jumlah sperma tersebut diperoleh dengan menggunakan haemocytometer (Anonymous, 2010).

2.1.4 Ciri-ciri ikan Nilem Betina Matang Gonad

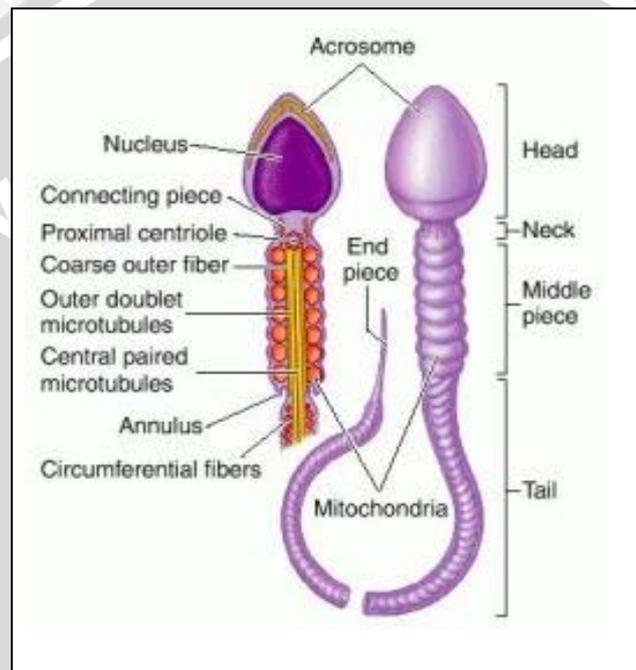
Umurnya mencapai 1-1,5 tahun. berat badan sekitar 100 g, bila diurut pelan-pelan ke arah lubang alat genital, induk betina akan mengeluarkan cairan berwarna kekuning-kuningan (Anonymous, 2008).

Induk Nilem betina memijah pada malam hari. Menjelang subuh, biasanya nilem akan memijah. Benih yang dihasilkan dari sepasang nilem berukuran 100-150 g sebanyak 15-000-30.000 ekor (Anonymous, 2010).

2.2 Proses Spermatogenesis

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

Sel yang hidup dan bergerak di dalam semen disebut spermatozoa. Spermatozoa yang normal terdiri dari kepala dan ekor (Gambar 2). Bagian ekor terbagi atas leher (tengah), bagian utama dan bagian ujung (Partodihardjo, 1992). Menurut Rachman (2003), spermatozoa adalah spermatosit sekunder yang membelah menjadi spermatid yang mengadakan metamorfosis menjadi gamet "*motile*" (dapat bergerak) dan mempunyai potensi fungsional.



Gambar 2. Struktur sperma (Anonymous 2010)

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

a. Bagian Kepala

Pada bagian kepala spermatozoa ini, terdapat inti tebal dengan sedikit sitoplasma yang diselubungi oleh selubung tebal. Selubung tebal yang dimaksud adalah akrosom, fungsi dari akrosom adalah untuk melindungi, juga menghasilkan enzim. Akrosom ini mengandung enzim pembuahan yaitu hialuronidase dan akrosin. Yang masing-masing enzim tersebut memiliki fungsi

yang berbeda. Hialuronidase merupakan enzim yang dapat melarutkan hialuronid pada korona radiata ovum, sehingga spermatozoa dapat menembus dan membuahi ovum. Sementara akrosin merupakan enzim protease yang dapat menghancurkan glikoprotein yang terdapat di zona pellusida ovum.

b. Bagian Badan

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

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

c. Bagian Ekor

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

Sperma adalah sel-sel spermatozoa yang berada dalam larutan seminal dan dihasilkan oleh hidrasi testes, atau salah satu bagian dari alat reproduksi ikan (Ari, 2008). Spermatozoa merupakan sel padat dan sangat khas, tidak tumbuh atau membagi diri serta tidak mempunyai peranan fisiologis apapun pada hewan

yang menghasilkannya, semata-mata hanya untuk membuahi telur pada jenis yang sama (Soeparna, 1980).

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

Ukuran diameter kepala sperma ikan antara lain seperti; ikan tawes (*Puntius japonicus*) 2,17 μ , nilem (*Osteochilus hasseltii*) 2,86 μ dan ikan mas (*Cyprinus carpio*) 2,55 μ dan ukuran panjang ekor sperma ikan tawes (*Puntius japonicus*) 33,15 μ , ikan nilem (*Osteochilus hasseltii*, Valenciennes) 25,11 μ , dan ikan mas (*Cyprinus carpio*) 35,65 μ (Rustidja, 2007).

2.2.1 Pengambilan Sperma Ikan Nilem

Induk jantan dilakukan stripping pada daerah perut sampai cairan sperma keluar. Kemudian sperma tersebut diberikan bahan pengencer yaitu NaCl fisiologis yang berfungsi untuk pengencer serta penambah nutrisi bagi sperma ikan (Anonymous, 2008).

Induk jantan ikan Nilem ditangkap dan dilakukan pengurutan (*stripping*) untuk mendapatkan sperma ikan Nilem. Sperma ditampung dalam tabung reaksi

yang berisi larutan NaCl Fisiologis dengan pengenceran 10 kali. Kemudian larutan sperma disimpan sementara dalam refrigerator suhu 4°C (Rustidja, 2007).

2.2.2 Stabilisasi Kondisi Sperma

Sperma yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama, karena kondisinya berubah. Oleh karena itu spermatozoa yang telah ditampung diusahakan mempunyai kondisi yang dapat mendukung kehidupannya. Salah satu cara yang digunakan adalah diberikannya bahan pengencer (NaCl fisiologis) (Rustidja, 1999). Menurut Anonymous (2008), tujuan penambahan larutan NaCl fisiologis adalah sebagai pengencer serta sebagai penambah nutrisi bagi sperma ikan.

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

2.2.3 Pergerakan dan Daya tahan hidup sperma

a. Pergerakan Sperma

Aktifitas spermatozoa dimulai ketika sperma bersentuhan dengan air, dengan demikian motilitas spermatozoa yang tinggi sangat berpengaruh terhadap terjadinya fertilisasi (Woynarovich dan Horvart, 1980). Menurut Fujaya (2004), spermatozoa bersifat immotil dalam cairan plasmanya dan akan bergerak

apabila bercampur dengan air. Gerak progresif secara berkesinambungan hanya terjadi satu menit setelah bersentuhan dengan air dan hanya 50% yang masih dapat berenang setelah 3 menit. Sebagian besar spermatozoa ikan air tawar dapat motil tidak lebih dari 2-3 menit setelah bersentuhan dengan air. Menurut Stoss dan Donaldson (1982), di dalam testes dan dalam seminal plasma, spermatozoa dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan selama musim pemijahan. Untuk ikan air tawar aktivasi spermatozoa terjadi jika perairan di sekitarnya bersifat hipotonik.

Motilitas merupakan nilai persentase pergerakan dan juga merupakan salah satu tolak ukur keadaan spermatozoa jantan (Sujana, 2007). Hermawanto dan Hadiwidjaja (2008) menjelaskan bahwa biasanya empat sampai enam lapangan pandang yang diperiksa untuk memperoleh pergerakan sperma secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan persentase setiap kategori motilitas. Perlu dilakukan pemeriksaan ulang dengan tetesan sperma kedua yang diperlakukan dengan tatacara sama. Kategori yang dipakai untuk mengklasifikasi motilitas sperma disebut dalam katagori sebagai berikut :

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

b. Kemampuan Hidup Sperma

Menurut Rachman (2003), jangka waktu hidup spermatozoa bergantung pada spesies dan substrat tempat mereka diletakkan. Jika sperma diletakkan

pada air maka jangka waktunya lebih pendek daripada berada pada tubuh hewan betina. Kemungkinan hidup sel sperma dipengaruhi juga oleh suhu secara umum, namun akan hidup lebih lama pada suhu yang lebih rendah.

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

Kemampuan hidup spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu. Penurunan suhu dari suhu kamar ke suhu dingin perlu dilakukan secara bertahap untuk menghindari terjadinya *cold shock* (Toelihere, 1981). Untuk memastikan apakah sperma yang tidak motil tersebut hidup atau mati, perlu dilakukan uji viabilitas sperma. Partodiharjo (1992) menyatakan bahwa setelah sperma mati, sedikitnya 100-2.000 sel atau yang terbaik 500 sel dihitung untuk menentukan prosentase spermatozoa yang hidup.

2.3 Efek Kejut Listrik Terhadap Sel Sperma

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

Tegangan listrik berperan besar dalam kegiatan transfer gen. Menurut Andre *et al.* (2008), kejut listrik pada jaringan otot memainkan dua peran, yaitu: merubah struktur permeabilitas serabut otot dan membantu perpindahan DNA melewati permeabilitas membran (Kemampuan membran untuk menyerap zat

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

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

2.4 Hubungan Motilitas dan Viabilitas Sperma

Kerusakan dapat terjadi pada sperma akibat gangguan proses spermatogenesis antara lain, pertama kerusakan mitokondria sehingga motilitas spermatozoa terganggu serta gangguan siklus spermatogenesis sehingga konsentrasi spermatozoa juga menurun. Dan untuk memastikan apakah spermatozoa yang tidak motil tersebut hidup atau mati, maka perlu dilakukan uji viabilitas spermatozoa. Sperma yang immotile/ motilitas $< 5\%$, dianjurkan untuk dilakukan pemeriksaan *viability assay* (Ningrum, 2006). Waktu motilitas dan

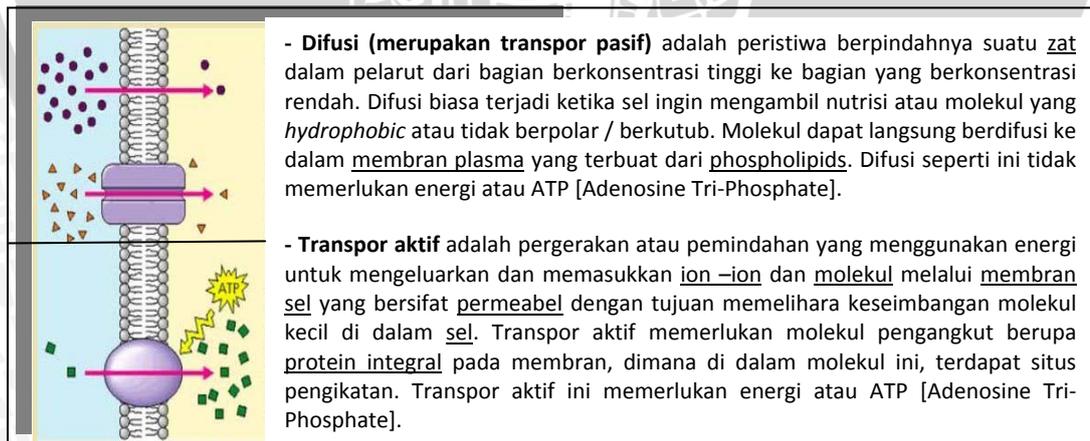
viabilitas spermatozoa akan berbanding terbalik yaitu semakin meningkatnya waktu motilitas spermatozoa maka akan semakin menurun waktu viabilitasnya (Hidayaturrehman, 2007).

Menurut Hidayaturrehman (2007) dengan adanya motilitas dan viabilitas spermatozoa maka dapat mengetahui kualitas spermatozoa yang baik untuk mendukung fertilisasi.

2.5 Metode Elektroporasi

Elektroporasi merupakan proses penerapan medan listrik (pulsa) untuk sel hidup dalam jangka waktu yang singkat. Elektroporasi memungkinkan pembentukan pori-pori pada molekul eksogen seperti DNA sehingga memungkinkan untuk masuk ke dalam sel. Elektroporasi merupakan teknik yang sangat efisien untuk memasukkan asam nukleat, protein, karbohidrat, RNA, pewarna, partikel virus dan molekul lain dalam berbagai macam sel seperti prokariotik dan eukariotik (Anonymous, 2010).

Proses masuknya molekul kedalam pori-pori membran sel dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 3. Proses masuknya molekul kedalam pori-pori membran sel

(Anonymous, 2010)

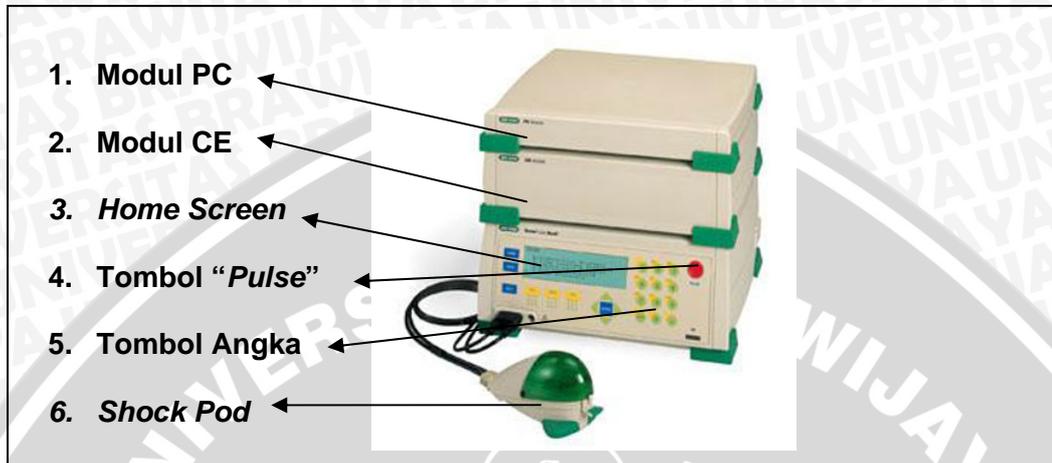
Pembuatan ikan transgenik yang efisien dan mudah dapat menggunakan metode elektroporasi. Bahkan dengan metode elektroporasi ini memungkinkan untuk memproduksi ikan transgenik secara masal (Tsai *et al.*, 1997). Metode elektroporasi menggunakan serangkaian listrik arus pendek untuk melemahkan membran sel guna membantu DNA rekombinan masuk dalam sel tertentu (Chent, 1995). Ditambahkan oleh Inoue *et al.* (1990) dalam Hackett (1993) bahwa metode elektroporasi ini pada tahun 1990 dianggap metode terbaik yang berhasil dalam transgenik ikan.

Metode elektroporasi yang umum digunakan untuk menghasilkan kondisi yang optimal terbukti memakan waktu. Dengan diperkenalkannya “*Gene Pulser* sistem elektroporasi” (Gambar 3.) kondisi optimal dapat ditentukan dengan cepat. *Gene Pulser* adalah sistem elektroporasi modular, yang mencakup unit utama, memiliki dua modul aksesori yaitu modul CE (*Cell Eukariotic*) dan modul PC (*Prokariotic Cell*). Modul CE digunakan untuk elektroporasi sel eukariotik, termasuk sel mamalia dan protoplas tanaman. Sedangkan modul PC digunakan untuk elektroporasi bakteri dan jamur serta aplikasi lain dimana pulsa tegangan tinggi diterapkan pada sampel volume kecil dan ketahanan tinggi. Sistem *Gene Pulser* menghasilkan bentuk gelombang *eksponensial* dan persegi (*square*), memungkinkan untuk memilih gelombang yang terbaik untuk proses elektroporasi. Baik secara *eksponensial* maupun *square* telah digunakan dengan sangat efektif untuk elektroporasi. Bentuk gelombang elektroporasi dapat memiliki dampak yang signifikan terhadap efisiensi transformasi pada tipe sel yang berbeda (Anonymous, 2010).

Modul CE (Sel Eukariotik) memiliki membran nukleus dan sistem endomembran. Sedangkan Sel prokariotik (PC) mempunyai membran plasma, sitoplasma yang mengandung ribosom, mesosom, kromator (pigmen) dan materi inti (DNA dan RNA) Sel prokariotik tidak mempunyai membran inti dan sistem

endomembran seperti retikulum endoplasma dan kompleks golgi. Selain itu tidak memiliki mitokondria dan kloroplas (Anonymous, 2010).

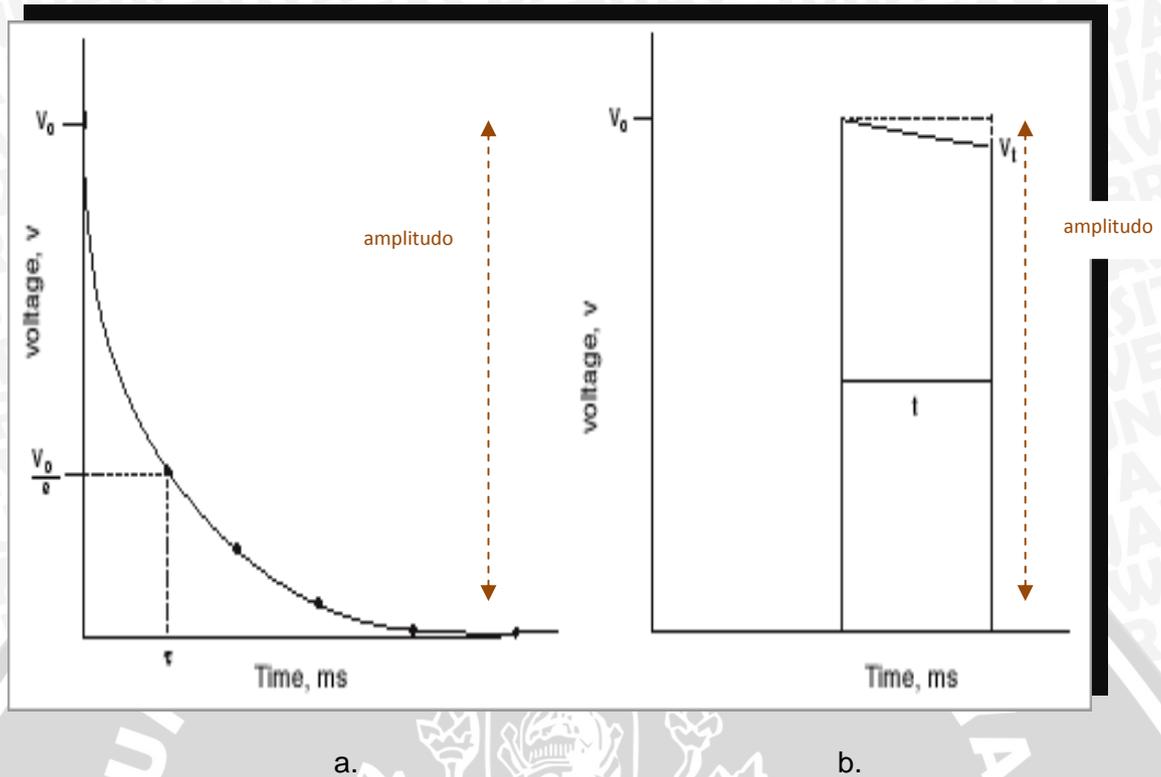
Alat untuk melakukan Elektroporasi tertera pada Gambar 4 berikut ini :



Gambar 4. Gene Pulser BIO-RAD (Anonymous, 2010)

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

Hubungan kedua parameter (Voltage dan lama kejutan) dapat dilihat pada grafik di Gambar 5 berikut ini :



Gambar 5. a. Eksponensial; b. Square Wave

Pada metode *Eksponensial* (**Gambar 5.a**), tegangan yang dilepaskan dari kapasitor yang dipilih, meluruh dengan cepat dari waktu ke waktu. Kejutkan yang diberikan dicirikan oleh kekuatan bidang (kV/cm) dan lama kejutkan yang konstan (ms). Penyesuaian tegangan pada *Gene Pulser* untuk jarak elektroda dikenal dengan kontrol kekuatan bidang. Kekuatan medan, hambatan dan nilai-nilai kapasitansi ditetapkan oleh waktu yang konstan dan tegangan yang diberikan. Pada metode ini, ketika sebuah kapasitor dibebankan ke tegangan V_0 dan kemudian dikejutkan ke dalam sel, maka Tegangan yang diberikan untuk sel akan semakin berkurang seiring bertambahnya waktu yang terlihat pada kurva *eksponensial*. Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Eksponensial* adalah tegangan (v), waktu (t) dan kekuatan bidang (cm).

Tegangan dari *Square wave* (**Gambar 5.b**) lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan yang mana untuk menjaga lamanya waktu kejutkan, kemudian dikembalikan ke nol. Amplitudo didefinisikan sebagai jarak terjauh dari

garis kesetimbangan dalam gelombang sinusoide Sedangkan pada metode *Square Wave*, dicirikan oleh tegangan (v) yang diberikan, panjang kejutan, jumlah kejutan dan panjang jarak diantara kejutan. Gelombang *square wave* dapat meningkatkan efisiensi dan kelangsungan hidup sel. *Eksponensial wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen. Pada metode ini panjang kejutan memiliki nilai yang sama dengan lama kejutan. Jika terjadi penurunan tegangan oleh peluruhan *eksponensial* pada akhir kejutan kejadian ini disebut kejutan layu dan diukur sebagai prosentase dari tegangan awal. Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Square wave* adalah tegangan, panjang kejutan, jumlah kejutan dan panjang interval diantara kejutan (Anonymous, 2006).

2.6 Elektroporasi Sperma

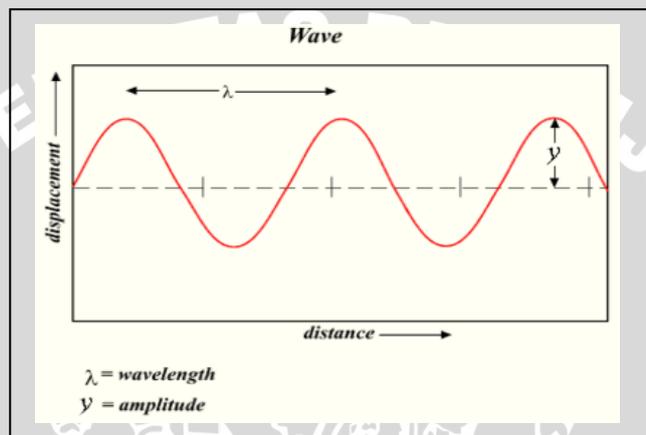
Sperma dapat menjadi vektor yang efisien dalam transfer gen. Efektifitas transfer gen dengan elektroporasi DNA pada sperma sangat dipengaruhi kondisi listrik dan parameter biologi (Anderson dan Evans, 1988). Menurut Symonds *et al.* (1994a) bahwa pengambilan DNA oleh sperma yang akan ditransfer tergantung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

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

2.7 Jenis-jenis Gelombang Terkait Dengan Gene Pulser

a. Gelombang sinusoide

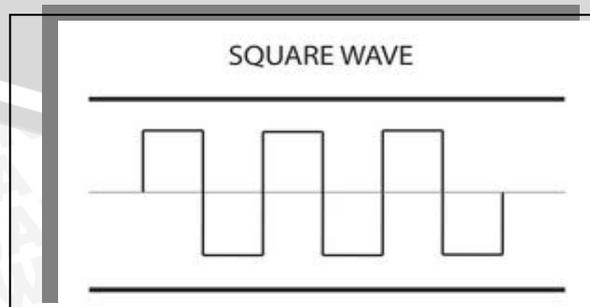
Gelombang sinusoide merupakan hal paling mendasar dari semua jenis bentuk gelombang lainnya, serta sangat penting dalam bidang elektronik. Gelombang sinusoidal biasa disebut juga sebagai gelombang harmonik sederhana. Hal ini disebabkan karena perpindahan setiap partikel yang dilalui oleh gelombang setiap satuan waktu dinyatakan dengan kurva sinus (Anonymous, 2010). Bentuk gelombang sinusoide bersifat eksponensial dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 6. Bentuk gelombang sinusoide

b. Gelombang nonsinusoide

Terdapat banyak bentuk gelombang nonsinusoide seperti bentuk segi empat (*square*), gigi gergaji (*sawtooth*), persegi panjang (*rectangular*), segi tiga (*triangular*) atau kombinasi dua bentuk gelombang seperti disebutkan. bentuk gelombang nonsinusoide yang paling umum yakni gelombang segi empat dan gelombang gigi gergaji (Anonymous, 2010). Bentuk gelombang kotak (*Square wave*) dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 7. Bentuk gelombang kotak (*Square wave*)

III MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi penelitian terdiri dari bahan-bahan penelitian dan alat-alat penelitian.

3.1.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Induk jantan ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) yang dibedah untuk diambil cairan spermanya.
- Larutan NaCl fisiologis, yang digunakan untuk memudahkan dalam mengambil sperma ikan Nilem yang sudah dielektroporasi (lampiran 5).
- Eosin-negrosin untuk pewarnaan sperma yang diamati viabilitasnya.
- Sperma ikan Nilem yang diamati motilitas (pergerakan spermatozoa) dan viabilitasnya.
- Aquadest yang digunakan untuk mengaktifkan sperma.
- Ovaprim yang digunakan untuk penyuntikan induk ikan yang bertujuan untuk mempercepat kematangan gonad.
- Air yang digunakan sebagai media hidup indukan ikan Nilem.
- Es Batu yang digunakan untuk mendinginkan cuvet sebelum digunakan untuk proses elektroporasi sperma.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Satu set alat elektroporator (BIO-RAD) yang digunakan untuk memberi kejutan listrik pada sperma ikan Nilem.
- Cuvet sebagai tempat sperma yang diberi kejutan listrik.

- Mikroskop yang digunakan untuk mengamati perkembangan sperma (di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya).
- Kolam pemeliharaan induk ikan Nilem yang digunakan untuk media hidup induk ikan Nilem (di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya).
- Bak plastik yang digunakan untuk memindah induk dari kolam ke dalam laboratorium.
- Obyek glass yang digunakan untuk melihat motilitas masal sperma yang diamati pergerakannya di bawah mikroskop.
- Cover glass yang digunakan untuk melihat motilitas individu sperma yang diamati pergerakannya di bawah mikroskop.
- Pipet volume untuk mengetahui jumlah volume sperma yang dihasilkan.
- Mikro pipet yang digunakan untuk mengambil sperma yang ada di mangkok dan mengambil Na Fisiologis.
- *Yellow tip* yang dipasangkan ke mikro pipet untuk mengambil cairan sperma dan NaCl fisiologis.
- Tissue yang digunakan untuk membersihkan alat-alat.
- Spuit yang digunakan untuk mengambil sperma induk ikan Nilem.
- Blower yang digunakan sebagai sumber aerasi.
- *Handtally counter* yang digunakan untuk menghitung jumlah sel sperma.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, dimana metode eksperimen adalah suatu metode yang dilakukan dengan mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variable-variabel. metode eksperimen adalah metode

penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain (Sastrosupadi, 2000).

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

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua perlakuan yang masing-masing perlakuannya diulang sebanyak tiga kali dan kontrol diberikan pada semua perlakuan yang fungsinya untuk membandingkan dengan perlakuan. Dalam penelitian ini, perlakuan yang digunakan adalah penggunaan metode yang berbeda pada pemberian kejutan Listrik dengan tegangan 40 volt, yaitu :

- Perlakuan A = pemberian kejutan listrik dengan metode Square Wave menggunakan parameter ukur tegangan (40 v).
- Perlakuan B = pemberian kejutan listrik dengan metode Eksponensial menggunakan parameter ukur tegangan (40 v).

Untuk membedakan atau membandingkan dua macam perlakuan umumnya dilakukan dengan uji t (t test). Pada prinsipnya berbeda atau tidaknya dua macam perlakuan tersebut dapat diketahui dari perbandingan t hitung (*calculated*) dan t daftar. Oleh karena itu, sebaiknya dilihat kembali tentang uji t dan sebaran nilai t (Sastrosupadi, 2000).

Soelistyowati (2003), menyatakan bahwa model umum uji t untuk 2 perlakuan yang mempunyai keragaman sama dan ulangan sama adalah sebagai berikut :

$$t_{hitung} = \left| \bar{A} - \bar{B} \right| \sqrt{\frac{n(n-1)}{JK_A + JK_B}}$$

Keterangan :

\bar{A} = Rata-rata perlakuan A

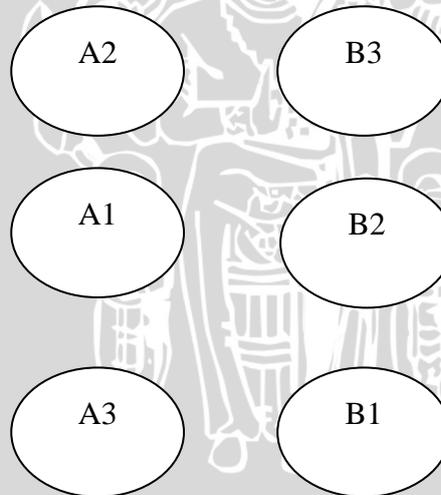
\bar{B} = Rata-rata perlakuan B

n = Ulangan

JK_A = Jumlah kuadrat perlakuan A

JK_B = Jumlah kuadrat perlakuan B

Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan sehingga terdapat 6 unit percobaan. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak kelompok dengan denah penelitian seperti pada Gambar 8 berikut ini :



Gambar 8. Denah Percobaan

Keterangan :

A = pemberian kejutan listrik dengan metode Square Wave

B = pemberian kejutan listrik dengan metode Eksponensial

1, 2, 3 = Ulangan perlakuan.



3.4 Prosedur Penelitian

Pertama menyiapkan alat elektroporasi (lampiran 4) sebagai alat kejutan listrik dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- Steker alat disambungkan ke sumber listrik yang sesuai.
- Tombol "POWER" di samping kanan alat ditekan untuk menyalakan alat.
- Tampilan awal yaitu "HOME SCREEN" akan muncul.
- Pada tampilan "HOME SCREEN" dipilih no 3 atau menggunakan panah ke atas atau ke bawah untuk memilih "Square wave protocol / Eksponensial protocol".
- Kemudian muncul tampilan detail metode *Square wave / Eksponensial protocol*, selanjutnya masukan beberapa parameter yang ditentukan seperti:
 - Lama kejutan + besar tegangan
 - Lama kejutan + besar tegangan + jumlah kejutan + interval tegangan
- Disiapkan *cuvette* yang akan dipakai yaitu *cuvette* ukuran 0,2 cm
- Setelah parameter yang dimasukkan sesuai maka disimpan dan diberi tanda dengan abjad, agar saat memberikan *pulse* dapat dilakukan dengan cepat.
- Tegangan yang dimasukkan 40 volt
- Lama kejutan yang digunakan yaitu 0,5 ms.
- Persiapan sampel dengan langkah sebagai berikut:
 - ✓ 25 μ l sperma dimasukan ke dalam *cuvette* menggunakan mikropipet setelah itu *cuvette* ditutup dengan rapat.
 - ✓ Tutup "shock pod" dibuka.
 - ✓ *Cuvette* berisi sampel dipasang pada "shock pod"
 - ✓ Kemudian "shock pod" ditutup kembali.
 - ✓ Sperma siap untuk diberi kejutan

- Setelah itu besar tegangan yang diberikan dipilih dengan memilih tanda, kemudian "enter" ditekan sehingga tampilan tegangan terbuka.
- Tombol "PULSE" ditekan untuk memulai memberikan kejutan pada sampel.
- Akan muncul tampilan yaitu hasil perlakuan yang diberikan pada sampel.
- Dicatat hasil dari penurunan tegangan yang muncul di layar alat elektroporator.

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

3.5 Parameter Uji Penelitian

a. Motilitas Spermatozoa

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

Lama penyimpanan sperma berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa pasca pembekuan, fertilitas dan daya tetas telur ikan. Semakin lama sperma disimpan akan terjadi penurunan terhadap motilitas, fertilitas dan daya tetas

telurnya (Rustidja 2000). Menurut Paisal (2008), motilitas sperma bisa dikatakan normal apabila 40% atau lebih sperma dapat bergerak dan dapat membuahi telur. Tetapi beberapa pusat laboratorium mengatakan bahwa nilai normal untuk motilitas sperma adalah 60% atau lebih, baru sperma dapat dikatakan normal dan mampu untuk membuahi telur.

Setelah sperma dikeluarkan dari gonad ikan Nilem, kemudian sperma diberi perlakuan tegangan 40 volt. Setelah itu dilakukan pengamatan motilitas untuk mengetahui prosentase nilai motilitasnya.

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

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

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

b. Viabilitas Spermatozoa

Kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testes berkisar antara satu sampai dua menit. Pada kondisi viabilitas, pemanfaatan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi sangat kecil ($\pm 10\%$).

Kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah. Penurunan suhu dari suhu kamar ke suhu dingin dan perlu dilakukan secara bertahap untuk menghindari terjadinya *cold shock* (Toelihere, 1981 dalam Rustidja, 2000).

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

3.6 Analisa Data

Untuk membedakan atau membandingkan dua macam perlakuan yaitu metode eksponensial dan square wave, dilakukan dengan uji t (t test). Pada prinsipnya berbeda atau tidaknya dua macam perlakuan tersebut dapat diketahui dari perbandingan t hitung (calculated) dan t tabel, sesuai dengan uji t yang dipilih.

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Sperma Kontrol

Induk ikan nilem yang digunakan sudah memenuhi kriteria standar indukan, sesuai Anonymous (2008) yaitu perutnya mengembang dan terasa empuk ketika diraba. berumur 8 bulan berat badan sekitar 100 g, bila dipijat perut ke arah alat genital, induk jantan akan mengeluarkan cairan seperti susu. Induk ikan Nilem jantan yang digunakan penelitian mempunyai kepadatan sel sperma sebesar $1,7 \times 10^9$ perml. Jumlah sperma tersebut diperoleh dengan menggunakan haemocytometer.

Sperma yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kualitas baik, hal tersebut terlihat dari motilitas dan viabilitas spermanya. Selama berlangsungnya penelitian, motilitas sperma yang didapat adalah sebesar 71,3% dan viabilitas yang didapat adalah sebesar 75%. Cara pengambilan sperma induk Nilem jantan yaitu melakukan striping pada ikan tersebut.

4.1.1 Motilitas Spermatozoa

Motilitas sperma kontrol sebelum elektroporasi (rata-rata 71,3%) lebih besar dibandingkan dengan motilitas sperma kontrol sesudah elektroporasi (rata-rata 46,6%). Hal ini disebabkan karena sperma kontrol sebelum elektroporasi masih segar dan baik, sedangkan sperma kontrol sesudah elektroporasi pengamatan dilakukan setelah perlakuan elektroporasi, sehingga kualitas sperma sudah dipengaruhi oleh jeda waktu perlakuan. Sehingga pengamatan motilitas kontrol sesudah elektroporasi baru diamati setelah sperma diberi perlakuan. Artinya sperma kontrol sebelum dan sesudah adalah sperma murni tanpa perlakuan kejutan listrik. Untuk lebih jelasnya waktu atau jeda saat perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Waktu pemberian perlakuan kejutan listrik

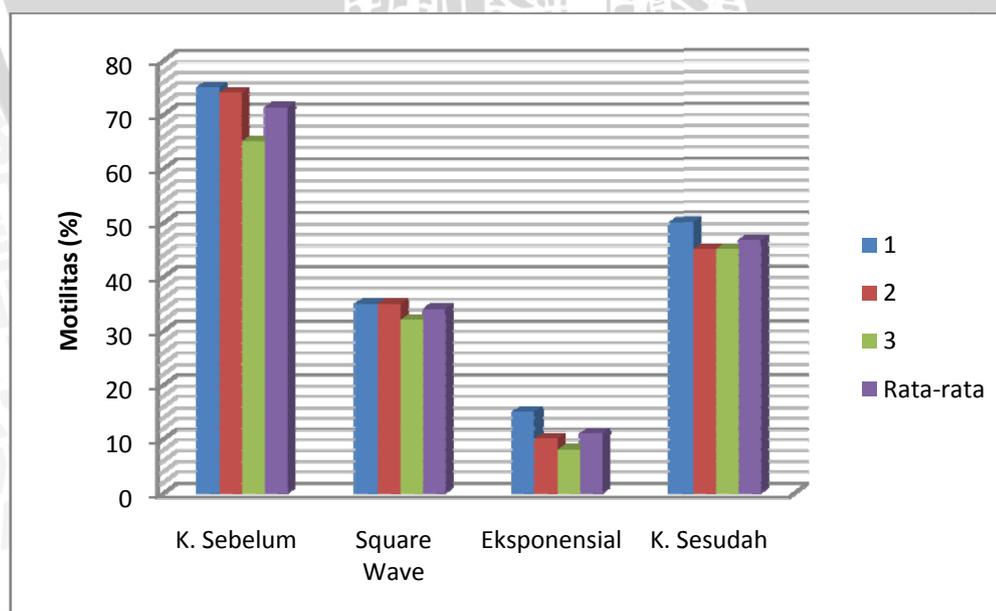
Perlakuan	Waktu Perlakuan (WIB)			Rata-Rata (menit)
	1	2	3	
Kontrol Sebelum	08:05	08:10	08:14	3
Square Wave	08:21	08:25	08:29	2,66
Eksponensial Wave	08:40	08:46	08:52	4
Kontrol Sesudah	09:04	09:11	09:20	5,33

Dari tabel di atas diketahui jeda saat pemberian perlakuan adalah 1 jam 15 menit, sehingga kualitas sperma kontrol sesudah menjadi menurun karena dibiarkan sampai 1 jam 15 menit. Hasil prosentase motilitas sperma ikan nilem dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini:

Tabel 2. Data nilai motilitas sperma ikan nilem (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Square Wave	35	35	32	102	34
Eksponensial Wave	15	10	8	33	11
K. Sebelum	75	74	65	214	71,3
K. Sesudah	50	45	45	140	46,6

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 9 di bawah ini :

**Gambar 9.** Nilai motilitas pada masing-masing perlakuan

Dari diagram tersebut terlihat bahwa nilai rata-rata persentase motilitas perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, dengan nilai rata-rata 34% untuk square wave, 11% untuk eksponensial dan 71,3% untuk kontrol sebelum dan 46,6% untuk kontrol sesudah. Adanya perbedaan nilai rata-rata motilitas sperma kontrol dengan perlakuan disebabkan karena pada kontrol sperma tidak diberi perlakuan apapun, berbeda dengan perlakuan square dan eksponensial wave yang masing-masing sperma diberi perlakuan kejutan listrik 40 volt. Menurut Evariny (2005) kejutan listrik akan berpengaruh terhadap produksi spermatozoa, sperma yang dikeluarkan dari testis bisa menjadi cacat dan dapat menurunkan tingkat motilitas spermatozoa serta dapat meningkatkan nilai mortalitas dan abnormalitas pada spermatozoa.

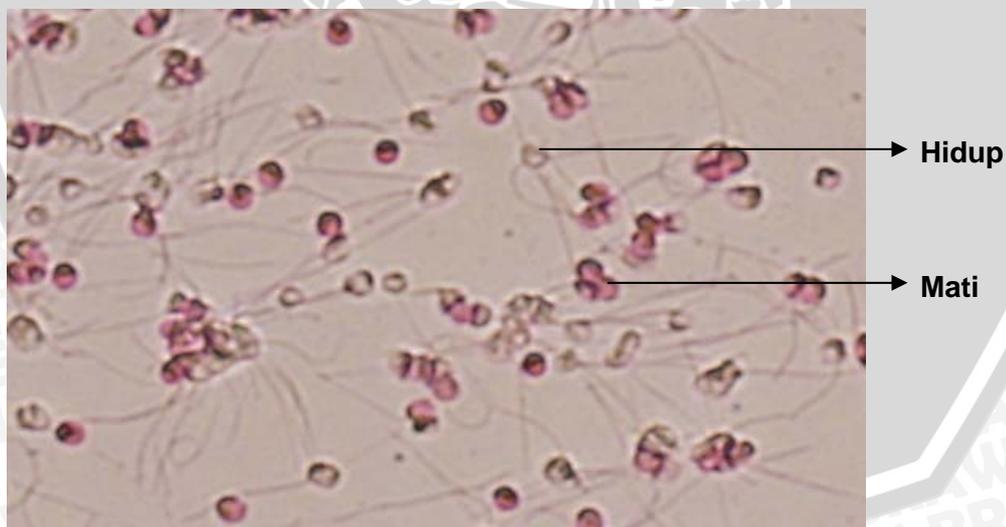
Kualitas sperma dengan tingkat motilitas 60 % dapat dikatakan bagus karena menurut Tabares (2007), pada penelitiannya menggunakan ikan *Brycon henni* (ikan air tawar) menunjukkan bahwa pada sperma kontrol memiliki tingkat motilitas 78 % karena dalam cairan seminal plasmanya terdapat ion yang lengkap seperti KCl, NaCl, CaCl₂ dan MgCl₂. Dan fungsi cairan seminal diantaranya; 1) mengembangkan kapasitas sperma dalam bergerak (Mochida *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 2001) dan 2) mempertahankan motilitas sperma saat bergerak dalam air (Morisawa dan Suzuki, 1980; Scott dan Baynes, 1980). Menurut pendapat Toelihere (1981), prosentase motilitas spermatozoa di bawah 40%, menunjukkan nilai motilitas spermatozoa yang kurang baik dalam proses pembuahan telur atau sering berhubungan dengan *infertilitas*.

Berdasarkan hasil perhitungan pada Lampiran 1 didapatkan hasil t_{hitung} (9,89) lebih besar dari $t_{tabel 1\%}$ (4,604), yang berarti metode memberikan pengaruh sangat nyata terhadap motilitas sperma atau dapat disimpulkan menerima H_1 dan menolak H_0 .

4.1.2 Viabilitas Spermatozoa

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

Gambar sperma nilem diwarnai dengan eosin negrosin tampak pada gambar 10 dan 11 di bawah ini :



Gambar 10. Gambar sperma (sperma yang hidup dan yang mati) pada metode Square Wave (perbesaran 400x)



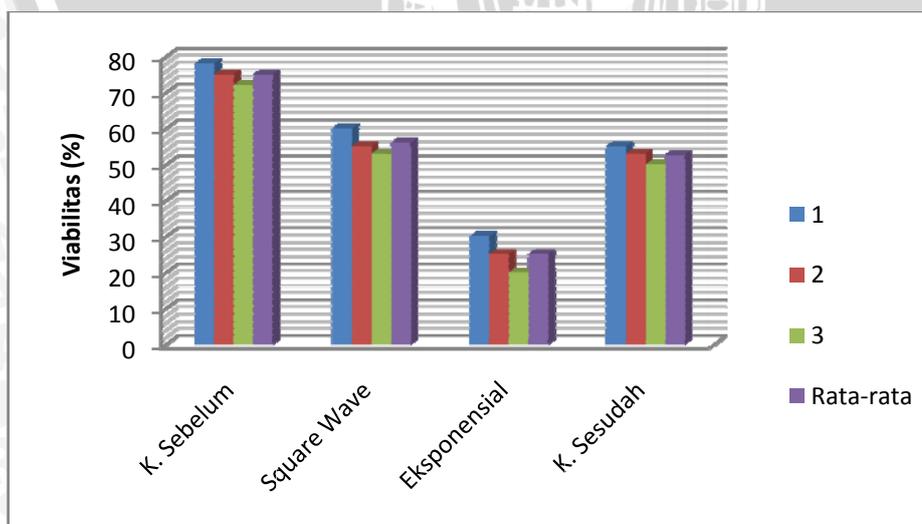
Gambar 11. Gambar sperma (sperma yang hidup dan yang mati) pada metode *Ekspensial wave* (perbesaran 400x)

Hasil pengamatan nilai viabilitas spermatozoa dapat dilihat pada tabel 3 lampiran 3.

Tabel 3. Data nilai viabilitas spermatozoa (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Square Wave	60	55	53	168	56
Ekspensial Wave	30	25	20	75	25
K. Sebelum	78	75	72	225	75
K. Sesudah	55	53	50	158	52,6

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 12 di bawah ini :



Gambar 12. Nilai viabilitas pada masing-masing perlakuan

Dari diagram tersebut terlihat bahwa rata-rata persentase viabilitas perlakuan lebih rendah dari pada rata-rata persentase viabilitas kontrol. Spermata kontrol tidak diberi perlakuan apapun, sedangkan spermata square dan eksponensial diberi perlakuan kejutan listrik 40 volt, inilah yang menyebabkan rata-rata persentase motilitas spermata kontrol lebih tinggi. Nilai persentase rata-rata motilitas spermata kontrol sebelum 75%, kontrol sesudah 52,6%, square wave 56%, dan eksponensial wave 25% (lihat lampiran 2). Menurut Weaver (1995), tegangan yang diberikan terhadap spermata menyebabkan terbukanya pori-pori sel membran, akan tetapi dapat juga sel rusak atau pecah yang mengakibatkan sel tersebut mati.

Berdasarkan hasil perhitungan pada lampiran 2 didapatkan hasil t_{hitung} (8,68) lebih besar dari $t_{tabel 1\%}$ (4,604) yang berarti metode berpengaruh sangat nyata terhadap viabilitas spermata atau dapat disimpulkan menerima H_1 dan menolak H_0 .

4.2 Kualitas Spermata Elektroporasi

Volume spermata yang diberi kejutan adalah sebesar 25 μ l, kemudian dimasukkan ke dalam cuvet tipe 0,2 mm, lalu diberi perlakuan kejutan listrik. Setelah spermata diberi kejutan listrik, spermata ditambahkan larutan NaCl fisiologis sebanyak 275 μ l agar kondisi spermata relatif stabil serta agar dalam pengambilan spermata lebih mudah. Spermata yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama, karena kondisinya berubah. Oleh karena itu spermata yang telah ditampung diusahakan mempunyai kondisi yang dapat mendukung kehidupannya. Salah satu cara untuk tetap menjaga kualitas spermata adalah dengan melakukan penambahan larutan fisiologis (NaCl fisiologis). Karena menurut Rustidja (1985) dalam Hidayatullah (2007) penggunaan larutan fisiologis yang mengandung

NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit.

Menurut Anonymous (2009), penambahan larutan dengan kandungan ion dapat meningkatkan resisten (ohm) sampel sehingga lama kejutan bertambah dan menimbulkan peningkatan suhu pada sampel, sehingga sampel sperma mati. Sel yang akan dielektroporasi sebaiknya dalam keadaan dingin supaya viabilitasnya tetap terjaga, karena pada saat kejutan listrik diberikan pada sel dapat menimbulkan panas yang nantinya dapat mengurangi viabilitas sel.

4.2.1 Metode *Square Wave*

Elektroporasi sperma dengan menggunakan metode *Square Wave* merupakan salah satu metode elektroporasi yang tegangannya lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan yang mana untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol bisa dilihat pada gambar 5 (Sin, 2001). Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Square wave* adalah tegangan, panjang kejutan, jumlah kejutan, dan panjang interval diantara kejutan (Anonymous, 2010).

Dari penelitian diperoleh hasil rata-rata nilai motilitas sperma ikan nilam setelah diberi perlakuan kejutan listrik dengan tegangan 40 volt dan lama tegangan 0,5 ms menggunakan metode *Square Wave* adalah sebesar 34%. Nilai motilitas ini lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai sperma kontrol sebelum diberi perlakuan kejutan listrik yaitu sebesar 71,3%. Penurunan motilitas ini dapat diakibatkan karena terjadinya adaptasi antara spermatozoa dengan tegangan sehingga mengakibatkan terjadinya gangguan terhadap permeabilitas membran atau selaput sperma, menurunkan aktivitas metabolisme, kerusakan sel dan penurunan motilitas. Hal ini sesuai dengan pendapat Jeyendran (1986) yang menyatakan bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa karena seperti yang diketahui permeabilitas

membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting peranannya dalam metabolisme sel. Ditambahkan oleh Tsai (2000) yang menyatakan bahwa motilitas sperma yang diperoleh sangat tergantung pada level tegangan selama elektroporasi.

Sedangkan nilai viabilitas sperma ikan nilam setelah diberi kejutan dengan menggunakan metode yang sama diperoleh rata-rata sebesar 56%. Nilai ini juga lebih kecil bila dibandingkan dengan rata-rata nilai viabilitas sperma kontrol sebelum diberi perlakuan yaitu sebesar 75%. Adanya penurunan nilai viabilitas sperma ini dapat disebabkan karena pemberian kejutan listrik dengan tegangan tinggi yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma dan penurunan motilitas sperma. Sedangkan untuk kontrol sesudah elektroporasi diamati untuk membandingkan antara nilai viabilitas sperma sebelum dielektroporasi dan sesudah dielektroporasi. Maxwell dan Watson (1996) menyatakan bahwa kerusakan membran spermatozoa akan berdampak pada membran yang pada awalnya mempunyai sifat permeabel, tidak lagi mampu menyeleksi keluar masuknya zat, yang akhirnya pada saat dilakukan uji warna eosin-negrosin zat tersebut bisa masuk ke dalam plasma. Ditambahkan oleh Tang dan Affandi (2001) dalam Yulham (2007) bahwa permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Apabila spermatozoa tersebut mati maka permeabilitas membrannya meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dengan spermatozoa yang mati.

4.2.2 Metode *Eksponensial Wave*

Elektroporasi sperma dengan metode *Eksponensial Wave* merupakan salah satu metode elektroporasi dengan menaikkan voltase sampai pada amplitudo yang diinginkan kemudian menurun secara eksponensial (Sin, 2001). Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap metode *Eksponensial*

adalah tegangan, waktu dan kekuatan bidang. *Eksponensial wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen. Pada metode ini panjang kejutan memiliki nilai yang sama dengan lama kejutan (Anonymous, 2010).

Dari penelitian diperoleh hasil rata-rata nilai motilitas sperma ikan nilem setelah diberi perlakuan kejutan listrik dengan tegangan 40 volt menggunakan metode Eksponensial Wave adalah sebesar 11%. Nilai persentase motilitas ini jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai sperma kontrol sebelum diberi perlakuan kejutan listrik sebesar 71,3%. Begitu juga dengan nilai rata-rata viabilitasnya yaitu sebesar 25%, juga jauh lebih rendah dibandingkan dengan rata-rata persentase sperma kontrol sebelum diberi kejutan listrik sebesar 75% dengan metode eksponensial. Sedangkan untuk kontrol sesudah elektroporasi dilakukan untuk membandingkan antara nilai viabilitas sperma sebelum dielektroporasi dan sesudah dielektroporasi. Menurut Nakamura (2009) menyebutkan bahwa penggunaan tegangan listrik tinggi yang diberikan pada sampel dapat menyebabkan produksi panas oleh generator yang bisa membunuh sebagian besar sampel yang dielektroporasi.

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

Berdasarkan hasil yang didapat dari perlakuan pemberian kejutan menggunakan dua metode elektroporasi yang berbeda diperoleh rata-rata nilai motilitas dan viabilitas dari penggunaan metode *Square Wave* ternyata lebih besar daripada nilai motilitas dan viabilitas dari penggunaan metode *Eksponensial Wave*. Hal ini kemungkinan karena kerusakan sel spermatozoa pada metode *Square Wave* lebih kecil dibanding dengan metode *Eksponensial*. Chen *et al* (2009) menyatakan bahwa metode *Square* dapat menghasilkan tegangan yang besar sehingga efisiensi pemasukkan DNA asing lebih besar karena pembukaan pori relatif lebih besar, namun gelombangnya sangat pendek

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

Pada metode Square Wave dicirikan dengan tegangan (*voltase*), panjang kejutan (*pulse length*), jumlah kejutan (*number of pulse*) dan jarak antara kejutan (*pulse interval*). Sedangkan pada metode Ekspensial Wave dicirikan dengan tegangan (*voltase*), lama kejutan (TC) dan hambatan (*resistence*). Dari perlakuan elektroporasi dengan menggunakan tegangan 40 volt pada metode Square Wave menghasilkan tegangan akhir 37 volt, panjang gelombang 0,5 ms, jumlah kejutan adalah 1 (satu). Selanjutnya pada metode Ekspensial menghasilkan tegangan akhir 37 volt dan waktu konstan (TC) 10,4 ms. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa lama kejutan atau panjang kejutan (*pulse length*) metode Ekspensial Wave lebih lama daripada Metode Square Wave, sehingga metode Ekspensial menghasilkan panas yang lebih besar yang mengakibatkan rusaknya sel spermatozoa.

Dari kedua metode tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan metode Square Wave lebih baik dari pada Metode Ekspensial Wave. Hasil ini terlihat dari nilai motilitas dan viabilitas sperma ikan nilam yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode Ekspensial.

V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Kondisi sperma kontrol sebelum dilakukan elektroporasi lebih baik dibandingkan kondisi sperma kontrol setelah dilakukan elektroporasi.
- Pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan nilam (*Osteochilus hasselti*).
- Penggunaan metode Square Wave lebih baik dari pada Metode Eksponensial Wave, karena nilai motilitas dan viabilitas sperma lebih tinggi dibandingkan pada metode Eksponensial.
- Metode square wave dapat menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga dapat mengurangi kerusakan sel spermatozoa.
- Lama kejutan atau panjang kejutan (*pulse length*) metode Eksponensial Wave lebih besar daripada Metode Square Wave, sehingga metode Eksponensial menghasilkan panas yang lebih besar yang mengakibatkan rusaknya sel spermatozoa.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian dapat disarankan sebagai berikut:

- Sebaiknya elektroporasi menggunakan metode Square Wave agar diperoleh nilai motilitas dan viabilitas sperma yang tinggi
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang elektroporasi dengan metode Square Wave pada sel telur ikan

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2006. **Gene Pulser Xcell Electroporation System**. Instruction Manual. BIO-RAD. Diakses tanggal 20 Mei 2010 pukul 19.05 WIB
- _____. 2007. **Nilem (*Osteochilus hasselti*)**. www.google.com. Diakses tanggal 20 mei 2010 pukul 19.10 WIB.
- _____. 2008. Struktur Sperma. <http://biodea.blogspot.com/2008/08/struktur-sperma.html> 2008
- _____. 2010. **Ikan Nilem**. http://Wikipedia.com/2010/10/Ikan_Nilem.html 2010
- Andre, F.M, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Gotzio, M. Cemazar, N. Pavscl, M. P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumann, J. Teissie and L. M. Mir. 2008. **Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor and Skin**. Diakses dari <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/hum.2008.060> pada tanggal 12 Februari 2010 pukul 10:27 WIB
- Arie, Usni. 2008. **Budidaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)**. <http://solusiikanmas.blogspot.com/2008/04/sperma-ikan-mas.html>. Diakses tanggal 11 Maret 2010 pukul 18.37 WIB.
- Carman, Ob. 1990. **Ploidy manipulation in some warm water fish**. Thesis, Sumited in Partial Fulfilment of Requirements for Degree of Master in Fisheries Science at The Tokyo University of Fisheries, 87 hal.
- Chent, T. T., Marsh, A., Shablott, M., Gonzalez-Villasenor, L. I., Powers, D. A., Wood. 1995. **Structure and Evolution of Fish Growth Hormone and Insulin – Like Groth Factor Genes in Fish Fisiology**. PP 179 – 209.
- Chent, T. T., Marsh, A., Shablott, M., Gonzalez-Villasenor, L. I., Powers, D. A., Wood. 1995. **Structure and Evolution of Fish Growth Hormone and Insulin – Like Groth Factor Genes in Fish Fisiology**. PP 179 – 209.
- Evariny, A. 2005. **Gali Soal Sperma Lebih Dalam**. astaga.com Selasa, 15 November. <http://www.hypno-birthing.web.id/?p=160>.
- Fujaya, Yushinta. 2004. **Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta. 179 hal
- Hermawanto, H. H dan Hadiwidjaja, D. B. 2008. **Analisis Sperma Pada Infertilitas Pria**. RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang. 26 Juli. 10.36 pm. <http://kamuseliz.wordpress.com/>. Diakses pada tanggal 07 Maret 2010 pukul 21.43 WIB.
- Hidayaturrahmah. 2007. **Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa**. Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Lambung

Mangkurat. Kalsel. Hal 9 – 18. <http://www.unlam.ac.id/bioscientiae>. Diakses pada tanggal 01 Januari 2010 pukul 07:56 WIB.

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

Lavitrano, M., Marcho, B., Maria, G. C., Roberto, G., Stefano, M. and Alessia. 2006. **Sperm Mediated Gene Transfer, Reprod. Fertility and Development 18**. CSIRO Publishing. Page 19 – 23.

Muller, F., Ivich, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvart, L and Maclean, N. 1992. **Introducing Foreign Gene Into Fish Eggs With Electroporated Sperm as Carrier**. *Mol. Biol. Biotechnol.* 1. page 276 – 281.

Nazir, M.. 2003. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Bogor.

Ningrum, D. R. 2006. **Pengaruh Fase Air Daun Gendarusa Vulgaris Nees Terhadap Motilitas, Viabilitas dan Konsentrasi Spermatozoa**. Theses Airlangga University, Surabaya. Diterbitkan pada tanggal 08 November. <http://www.adln.lib.unair.ac.id>

Paisal. 2008. **Pemeriksaan Sperma**. 07 September 2008. <http://www.wartamedika.com/2008/09/pemeriksaan-sperma.html>. Diakses pada tanggal 09 Juni 2010 pukul 07:55 WIB.

Partodihardjo. 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Jakarta.

Rachman, A. 2003 **Sistem Organ Pernafasan, Peredaran Darah, Ekskresi, Reproduksi, Syaraf dan Hormon**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang

Rustidja. 2007. **Pengamatan Histologi Reproduksi, Preservasi dan Uji Motilitas**. Laporan Praktikum Mata Kuliah Fisiologi Reproduksi. <http://mahasiswa.blogspot.com/2007/12/pengamatan-histologi-reproduksi.html>. Diakses tanggal 17 April 2010 pukul 08:17 WIB.

_____. 1999. **Pemisahan Spermatozoa X dan Y Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 76 hal.

_____. 2000. **Prospek Pembekuan Sperma**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 68 hal.

_____. 2006. **Diktat Kuliah Breeding dan Reproduksi Hewan Air**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang

Saanin, H. 1984. **Taksionomi dan Kunci Identifikasi Ikan**. Bina Cipta. Bandung. 40 hal.

Sastrosupadi, A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian**. Kanisius. Yogyakarta. 276 hal.

- Sin, F.Y.T, Walker S.P, Symonds J.E, Sin I.L. 2008. **Sperm Mediated Gene Transfer in Chinook Salmon**. Diakses dari <http://www.heb.pac.dfo-mpo.gc.ca>. Diakses pada tanggal 21 April 2010 pukul 19:06 WIB.
- Sin, F.Y.T, Walker S.P, Symonds J.E, Sin I.L. 2008. **Sperm Mediated Gene Transfer in Chinook Salmon**. Diakses dari <http://www.heb.pac.dfo-mpo.gc.ca>. Diakses pada tanggal 27 Februari 2010 pukul 19:06 WIB.
- Sulistiyowati. 2003. **Diktat Kuliah Rancangan Percobaan Penelitian**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 4 – 5
- Symond, J. E., Walker S. P. and Sin, F. Y. T. 1994a. **Development of Mass Gene Transfer Method in Chinok Salmon ; Optimazation of Gene Transfer by Elektroporated Sperm**. Mol. Mar. Biol. Biotech 3. page 104–111.
- Tang, M. U. dan R. Affandi. 2001. **Biologi reproduksi Ikan**. P2KP2 UNRI. Riau.165 hal/
- Toelihere, Mozes R. 1985. **Fisiologi Reproduksi Pada Ternak**. Angkasa. Bandung.
- Tsai, H. J., Lai, C., and Yang, H. S. 1997. **Sperm as Carrier to Introduce an Exogenous DNA Fragment Into Oocyte of Japanese Abalone Transgenics**. Res. 8. 313 – 315.
- Weaver, J. C. 1993. **Electroporation: A General Phenomenon For Manipulating Cells and Tissues**. J. Cell Biochem. 51: Page 426-435.
- Wira . 2007a. **Tingkah Laku Pemijahan Biota akuatik (part 2)**. Diakses dari <http://maswira.blogspot.com> Diakses pada tanggal 21 Maret 2010 pukul 14:59 WIB.

Lampiran

Data motilitas dan viabilitas sperma ikan nilem

Ulangan	Metode A (Eksponensial)	Metode B (Square Wave)
1	a_1	b_1
2	a_2	b_2
3	a_3	b_3
Total	ΣA	ΣB
Rata ²	\bar{A}	\bar{B}

$$JK_A = a_1^2 + a_2^2 + a_3^2 - \frac{(\Sigma A)^2}{3} = P$$

$$JK_B = b_1^2 + b_2^2 + b_3^2 - \frac{(\Sigma B)^2}{3} = Q$$

$$t_{\text{hitung}} = \left| \bar{A} - \bar{B} \right| \sqrt{\frac{n(n-1)}{JK_A + JK_B}}$$

$t_{\text{hitung}} > t_{\text{tabel } 1\% (2(n-i))}$ —————> Perlakuan A dan B berbeda sangat nyata

$t_{\text{tabel } 1\% (2(n-i))} < t_{\text{hitung}} < t_{\text{tabel } 5\% (2(n-i))}$ —————> Perlakuan A dan B berbeda nyata

$t_{\text{hitung}} < t_{\text{tabel } 5\% (2(n-i))}$ —————> Tidak ada perbedaan antara perlakuan A dan B

Metode (Eksponensial dan Square Wave) yang terbaik adalah metode yang menghasilkan motilitas dan viabilitas yang tinggi terhadap sperma ikan nilem.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Motilitas Sperma Ikan Nilem dan Perhitungan Statistik

Data Motilitas Sperma Ikan Nilem

Ulangan	Metode A (Eksponensial) %	Metode B (Square Wave) %
1	15	35
2	10	35
3	8	32
Total	33	102
Rata - Rata	11	34

$$JK_A = 15^2 + 10^2 + 8^2 - \frac{(33)^2}{3} = 389 - 363 = 26$$

$$JK_B = 35^2 + 35^2 + 32^2 - \frac{(102)^2}{3} = 3474 - 3468 = 6$$

$$t_{hitung} = |11 - 34| \sqrt{\frac{3(3-1)}{26+6}} = 23 \times 0,43 = 9,89$$

$$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} = t_{table\ 5\% (4)} = 2,776$$

$$t_{tabel\ 1\% (2(n-i))} = t_{table\ 1\% (4)} = 4,604$$

$t_{hitung} > t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$ —————> Perlakuan A dan B berbeda sangat nyata

$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} < t_{hitung} < t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$ —————> Perlakuan A dan B berbeda nyata

$t_{hitung} < t_{tabel\ 5\% (2(n-i))}$ —————> Tidak ada perbedaan antara perlakuan A dan B

Dapat disimpulkan berdasarkan nilai persentase motilitas bahwa perlakuan Metode Eksponensial dan Square Wave berbeda sangat nyata ($9,89 > 4,604$)



Lampiran 2. Data Viabilitas Sperma Ikan Nilem dan Perhitungan Statistik

Data Viabilitas Sperma Ikan Nilem

Ulangan	Metode A (Eksponensial) %	Metode B (Square Wave) %
1	30	60
2	25	55
3	20	53
Total	75	168
Rata - Rata	25	56

$$JK_A = 30^2 + 25^2 + 20^2 - \frac{(75)^2}{3} = 1925 - 1875 = 50$$

$$JK_B = 60^2 + 55^2 + 53^2 - \frac{(168)^2}{3} = 9434 - 9408 = 26$$

$$t_{hitung} = |25 - 56| \sqrt{\frac{3(3-1)}{50+26}} = 31 \times 0,28 = 8,68$$

$$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} = t_{table\ 5\% (4)} = 2,776$$

$$t_{tabel\ 1\% (2(n-i))} = t_{table\ 1\% (4)} = 4,604$$

$t_{hitung} > t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$ —————> Perlakuan A dan B berbeda sangat nyata

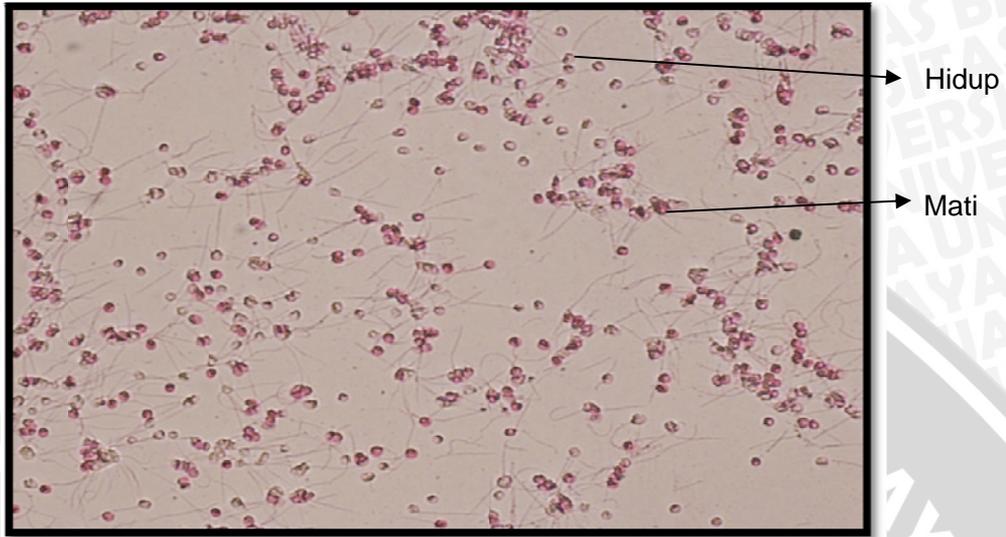
$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} < t_{hitung} < t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$ —————> Perlakuan A dan B berbeda nyata

$t_{hitung} < t_{tabel\ 5\% (2(n-i))}$ —————> Tidak ada perbedaan antara perlakuan A dan B

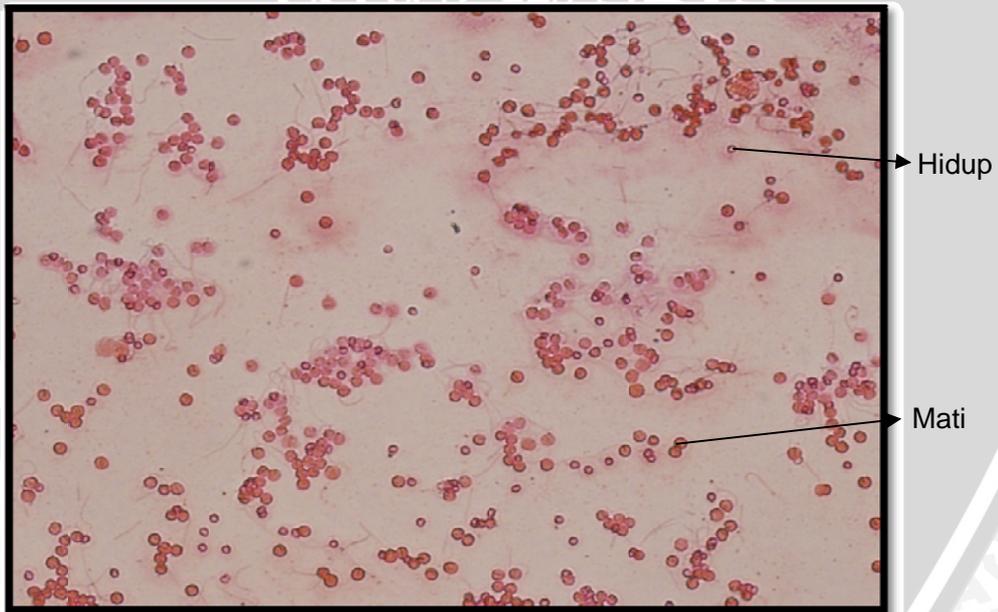
Dapat disimpulkan berdasarkan nilai persentase viabilitas bahwa Perlakuan Metode Eksponensial dan Square Wave berbeda sangat nyata ($8,68 > 4,604$).



Lampiran 3. Gambar Pewarnaan Sperma Ikan Nilem Pada Masing-masing Metode



a. Gambar Sperma Ikan Nilem (Metode *Square Wave*) perbesaran 400x



b. Gambar Sperma Ikan Nilem (Metode *Eksponensial Wave*) perbesaran 400x

Lampiran 4. Gambar Alat-alat yang digunakan Pada Saat Penelitian



a. Elektroporator Gene Pulser



b. Cuvet dengan ukuran 2 mm



c. Mikropipet



d. Mikroskop "Olympus BX 51" Tipe DIC

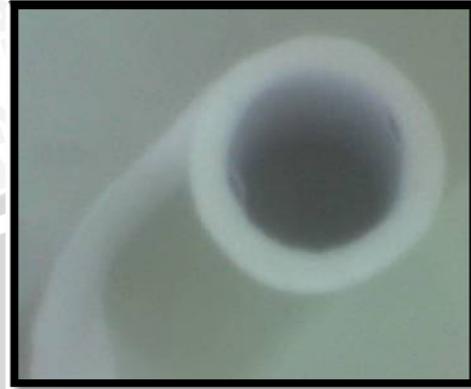


e. Yellow Tip

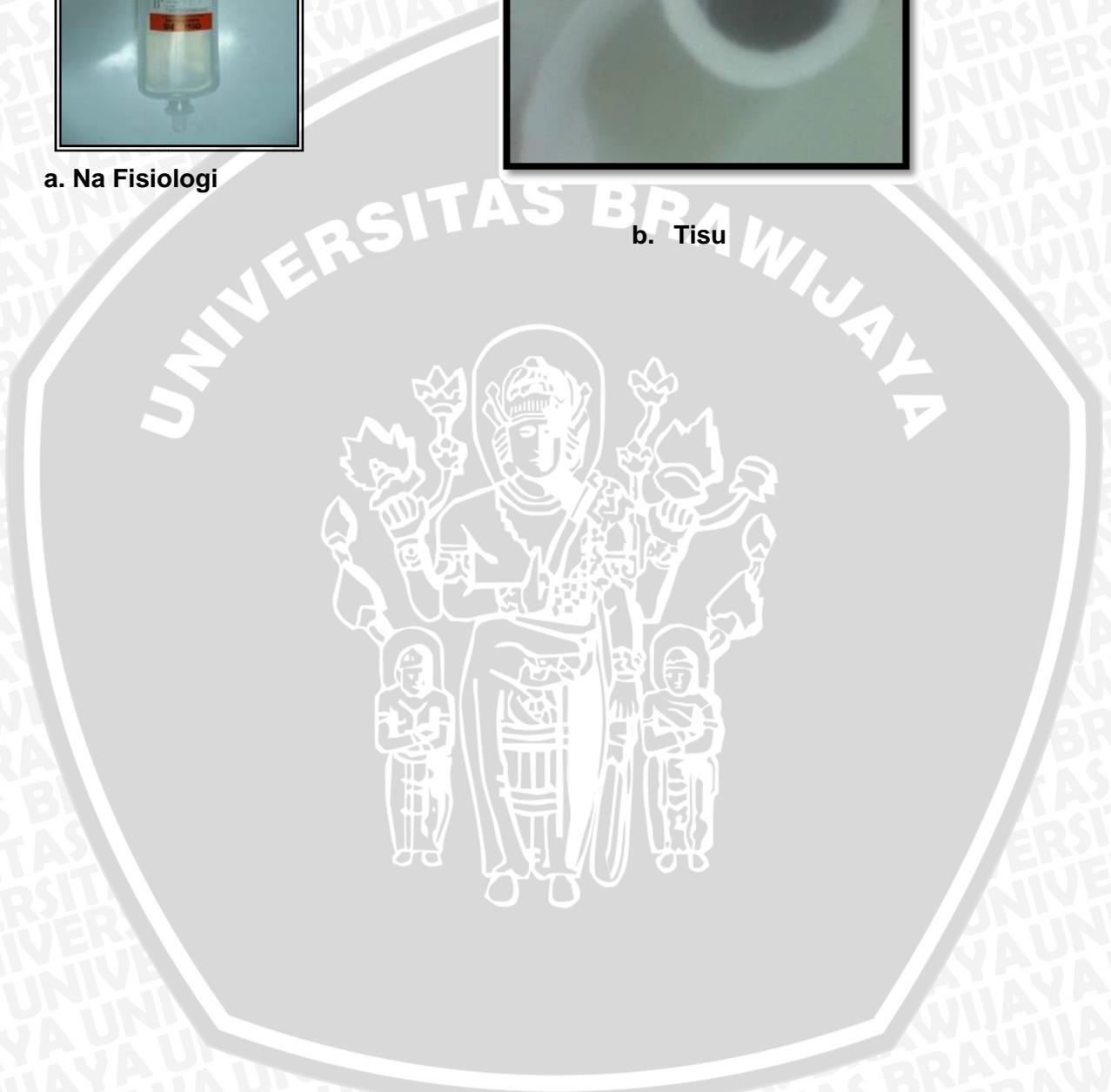
Lampiran 5. Gambar Bahan Yang Digunakan Saat Penelitian



a. Na Fisiologi



b. Tisu



Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi Jumlah Sperma Ikan Nilem

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

Bidang Pandang	Jumlah Sel Sperma
I	100
II	104
III	111
IV	114
V	110
Total	539

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

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi sperma} &= \frac{539}{5} \times 16 \times 10^4 \times 10^2 \\
 &= 1724,8 \times 10^6 \text{ sel/ml} \\
 &= 1,7 \times 10^9 \text{ sel/ml}
 \end{aligned}$$