

repository.ub.ac.id

**AKTIFITAS GREEN FLOURESCENT PROTEIN (GFP) SEBAGAI REPORTER
GEN PADA SPERMA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti*)**

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

Oleh :

SAIFUL BAKHRI

NIM. 0510850056



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2011



**AKTIFITAS GREEN FLOURESCENT PROTEIN (GFP) SEBAGAI REPORTER
GEN PADA SPERMA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti*)**

**SKRIPSI
BUDIDAYA PERAIRAN**

Oleh :

SAIFUL BAKHRI

NIM. 0510850056

**Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 16 AGUSTUS 2011 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat**

Mengetahui,
Dosen Penguji I

(Dr.Ir. AGOES SOEPRIJANTO, MS)

NIP: 19590807 198601 1 001

Tanggal: _____

Dosen Penguji II

(Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS)

NIP: 19600425 198503 1 002

Tanggal: _____

Dosen Pembimbing I

(DR.Ir.ABDUR RAHEM FAQIH, MS)

NIP: 19671010 199702 1 001

Tanggal: _____

Dosen Pembimbing II

(ATING YUNIARTI, Spi, M.AQUA)

NIP: 19750604 199903 2 002

Tanggal: _____

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(DR.Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

NIP: 19600322 198601 1 001

Tanggal : _____

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ;

1. Bapak. Ir. Abdul Rahem Faqih. MSi. Selaku Dosen Pembimbing I.
2. Ibu Ating Yuniarti. Spi, M.AQUA Selaku Dosen Pembimbing II.
3. Bapak Dr.Ir. Agoes Soeprijanto, MS Selaku Dosen Penguji I.
4. Bapak Ir. Maheno Sri Widodo, MS Selaku Dosen Penguji II.
5. Sujud dan terima kasih yang sedalam-dalamnya penulis persembahkan kepada ibunda dan ayahanda tercinta atas dorongan dan motivasi tiada henti kepada penulis serta kebijaksanaan dan Do'a beliau semua.
6. Desi, Zeni, Soleha, Septi, Mas Bonek, Agung Prasetya, Dewi, Hedyat, Chandra, Angga, Mucez bagai teman satu tim yang selalu membantu panulis dalam pengumpulan data dan pelaksanaan penelitian, mereka selalu memotivasi penulis agar penulis cepat menyelesaikan Laporan ini.
7. Mas Udin dan Pak Yit yang telah memberi tempat di Laboratorium *Breeding*, sehingga penulis dapat melakukan penelitian ini.
8. Ucup, saiful, Anggit, Kris, Gus Ton semua temen-teman serumah terima kasih atas bantuannya dan semangat yang telah di berikan selama ini kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan ini.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan karunia, rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan skripsi yang berjudul “Efektifitas Gen Green Folurescence Protein (GFP) Sebagai Reporter Gen Pada Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)”

Laporan Skripsi ini memuat hasil penelitian mengenai tegangan, jumlah kejutan, lama kejutan dan konsentrasi DNA yang baik untuk diaplikasikan dalam kegiatan transgenik dengan menggunakan metode elektroporasi. Semoga laporan ini dapat memberikan informasi bagi para pembaca dan mendorong perkembangan teknologi molekular dalam bidang perikanan.

Penulis menyadari bahwa Laporan Skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak demi perbaikan laporan ini. Harapan penulis semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi para pembacanya.

Malang, 11 Juli 2011

Penulis

RINGKASAN

SAIFUL BAKHRI. "Efektifitas Gen Green Fluorescence Protein (GFP) Sebagai Reporter Gen Pada Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)". Dibawah bimbingan Ir. **ABD. RAHEM FAQIH, MS** dan **ATING YUNIARTI, Spi. M.AQUA**

Elektroporasi adalah salah satu metode transfer gen yang menggunakan serangkaian getaran elektrik pendek untuk membuka pori-pori membran sel, dengan demikian molekul DNA dapat masuk ke dalam sel. Sperma sebagai media transfer gen memiliki kemampuan mengikat dan memasukkan DNA asing serta memindahkannya ke dalam telur saat fertilisasi. Untuk mengetahui keberhasilan transfer gen, dapat digunakan *Green Fluorescent Protein* (GFP) sebagai gen marker.

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh tegangan listrik (*Voltase*), lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) terhadap pergerakan (motilitas) sperma, kemampuan hidup (viabilitas) sperma, kemampuan sperma membuahi telur (fertilitas) serta gambaran ekspresi gen GFP pada sperma, embrio dan larva ikan nilem (*Osteochilus hasselti*). Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang menguji pengaruh dua faktor yaitu lama kejutan (0,5 ms dan 1 ms) dan jumlah kejutan (2x, 4x, 6x kejutan) dengan dua kali ulangan. Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Biologi dan Reproduksi ikan (laboratorium Breeding) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) universitas brawijaya Malang mulai bulan September 2010 sampai April 2011.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa perlakuan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) memberikan hasil yang berbeda nyata terhadap motilitas, mortalitas, fertilitas dan daya tetas tetapi tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap integrasi GFP ke inti sperma.

GFP terlihat terintegrasi pada semua sel sperma perlakuan, hasil persentase integrasi GFP pada inti sperma dengan nilai tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 53,25%. Transfer GFP dengan metode elektroporasi menghasilkan pendaran intensitas sperma tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 1900 *arbitrary*, pada embrio nilai tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 3950 *arbitrary* serta larva nilai tertinggi sebesar 3300 *arbitrary* pada kepala dan perut, sedangkan pada bagian ekor sebesar 2300 dengan perlakuan 0,5 ms 6x.

Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa promoter β -actin medaka efektif dalam mengekspresikan GFP sebagai gen target.

Kualitas air media penetasan telur berada dalam kondisi normal dengan nilai dengan suhu 27-30 °C, pH 7,61 sedangkan DO sebesar 4,42 sampai 5,80 mg/l.

DAFTAR ISI

JUDUL	
KATA PENGANTAR	i
RINGKASAN	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Hipotesis	4
1.5. Kegunaan Penelitian	4
1.6. Tempat dan Waktu	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi Ikan Nilem	6
2.1.2 Morfologi dan Biologi Ikan Nillem	7
2.1.3 Ciri-ciri Ikan Nilem jantan yang Matang Gonad	8
2.1.4 Ciri-ciri Ikan Betina yang Matang Gonad	8
2.2. Morfologi Sperma Ikan	9
2.2.1 Proses Pembentukan Spermatozoa	11
2.2.2 Kandungan Biokimiawi Sperma	13
2.2.3 Motilitas Sperma	14
2.2.4 Viabilitas Sperma	16
2.2.5 Larutan Buffer Sperma	16
2.3. Sperma Media Transfer Gen	18
2.4. Metode Elektroporasi	19
2.5. GFP sebagai Marker Biologi	26
2.6. Promoter β -actin Medaka	28
2.7. Confocal Laser Scanning Microscopy	29
2.8. Propidium Iodide	33
2.9. Ekspresi Gen	35
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1. Materi Penelitian	38
3.1.1 Alat	38
3.1.2 Bahan	38
3.2. Metode Penelitian	38
3.3. Rancangan Penelitian	39
3.4. analisa Data	41
3.5. Prosedur Penelitian	41
3.5.1 Persiapan Penelitian	41

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian	42
3.6 . Parameter Penelitian	48
3.6.1 Parameter Utama.....	48
3.6.2 Parameter Penunjang	49
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Motilitas Sperma Kontrol Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	50
4.2. Motilitas Sperma Perlakuan Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>).....	51
4.3. Mortalitas Sperma Kontrol Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	55
4.4. Viabilitas Sperma Perlakuan Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>).....	58
4.5. Fertilitas Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>).....	62
4.6. Daya Tetas Telur Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>).....	66
4.7. Ekspresi gen GFP.....	69
4.7.1. Ekspresi Gen GFP pada Sperma Ikan Nilem (<i>Ostechillus hasselti</i>)	69
4.7.2. Ekspresi Gen GFP pada Embrio Ikan Nilem (<i>Ostheochilus hasselti</i>)	75
4.7.3. Ekspresi Gen GFP pada Larva Ikan Nilem (<i>Ostheochilus haseltii</i>)	78
4.8. Kualitas Air	80
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	82
5.2. Saran.....	82

DAFTAR PUSTAKA

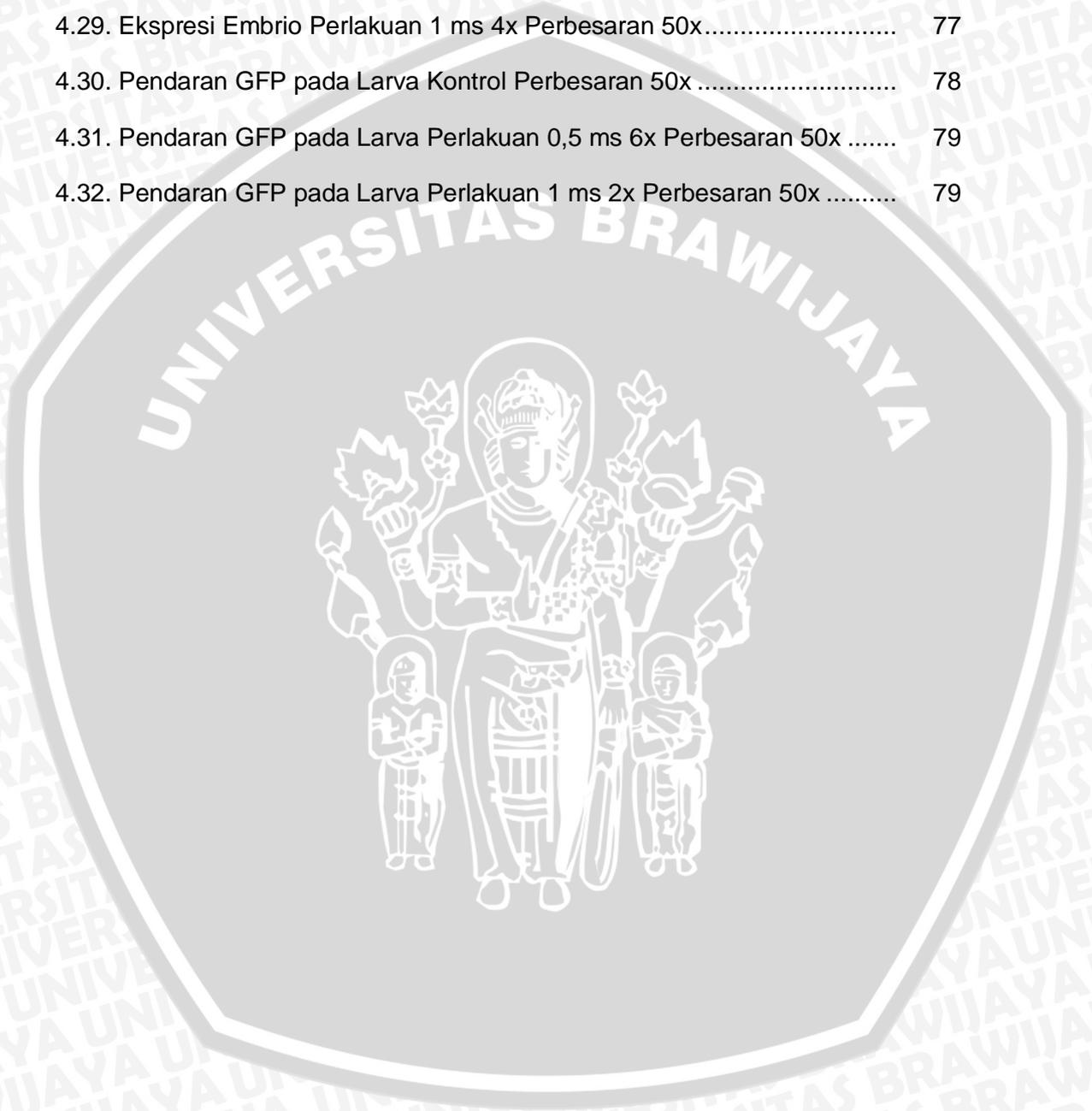
LAMPIRAN



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Ikan Nilem.....	6
2.2. Anatomi sperma.....	11
2.3. Proses Pembentukan Sperma	12
2.4. Ilustrasi proses terbukanya sementara membran dan penyusunan ulang selama elektroporasi.....	21
2.5. Proses membukanya membran selama elektroporasi.....	22
2.6. Medan listrik saat elektroporasi.....	24
2.7. Rangkaian dasar tegangan listrik yang digunakan untuk elektroporasi ..	25
2.8. Ubur-ubur dari klas <i>Aequorea Victoria</i>	27
2.9. Prinsip kerja mikroskop.....	31
2.10. Sel sperma mengikat huZP2 pada embrio tikus setelah fertilisasi	33
2.11. Struktur GFP	37
3.12. Denah penelitian.....	41
4.13. Grafik Motilitas 100%.....	52
4.14. Hubungan antara Lama Kejut dan motilitas.....	54
4.15. Sperma Ikan Nilem dengan Pewarnaan <i>Eosin Negrosin</i>	57
4.16. Viabilitas Perlakuan Sperma Ikan Nilem	59
4.17. Grafik Hubungan antara Lama Kejut dan viabilitas Sperma	60
4.18. Grafik Daya Fertilitas.....	62
4.19. Grafik Hubungan antara Lama Kejut dan Jumlah Kejut	63
4.20. Daya Tetas Telur Ikan Nilem.....	67
4.21. Hubungan Antara Lama Kejut dan Daya Tetas	68
4.22. Grafik Integrasi GFP Pada Inti Sperma	69
4.23. Integrasi Sperma pada Perlakuan 0,5 ms 6x.....	70
4.24. Ekspresi Sperma kontrol dengan perbesaran 2400x.....	72

4.25. Ekspresi sperma perlakuan 0,5 ms 6x dengan perbesaran 2400x	75
4.26. Ekspresi sperma perlakuan 0,5 ms 2x dengan perbesaran 2400x	73
4.27. Ekspresi Embrio Kontrol dengan perbesaran 50x	75
4.28. Ekspresi Embrio Perlakuan 0,5 ms 4x perbesaran 50x.....	76
4.29. Ekspresi Embrio Perlakuan 1 ms 4x Perbesaran 50x.....	77
4.30. Pendaran GFP pada Larva Kontrol Perbesaran 50x	78
4.31. Pendaran GFP pada Larva Perlakuan 0,5 ms 6x Perbesaran 50x	79
4.32. Pendaran GFP pada Larva Perlakuan 1 ms 2x Perbesaran 50x	79



DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

4.1. Persentase Integrasi GFP pada Inti Sperma 70



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan Penelitian.....	97
2. Uji Normalitas dan Analisa Data Motilitas(%) Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	102
3. Analisa Data Viabilitas (%)Sperma Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	104
4. Analisa Data Fertilitas (%)Sperma Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	105
5. Analisa Data Daya tetas (%)Embrio Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)....	106
6. Analisa Data Integrasi GFP pada Inti Sperma Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>).....	107
7. Hasil Pengamatan Fluoresensi Sperma dengan Mikroskop Konfokal (Perbesaran 2400x).....	108
8. Analisa Intensitas Pendaran GFP pada Sperma	111
9. Hasil Pengamatan Daerah Integrasi GFP pada Sperma dengan Mikroskop Konfokal	116
10. Hasil Pengamatan Fluoresensi Embrio (perbesaran 50x)	119
11. Hasil Analisa Intensitas Pendaran GFP pada Embrio	123
12. Ekspresi GFP pada Larva	128
13. Hasil Analisa Intensitas Pendaran GFP pada Larva	133
14. Perhitungan Konsentrasi Sperma Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>).....	137
15. Ukuran Dimensi Sel Sperma	138
16. Data Mortalitas Sperma Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	139
17. Data Viabilitas Sperma Ikan Nilem (<i>Osteochilus hasselti</i>)	140

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyediaan bahan pangan merupakan masalah yang terus-menerus diupayakan pemecahannya untuk kesejahteraan manusia, salah satunya melalui pembangunan perikanan, yaitu melalui berbagai terobosan untuk meningkatkan hasil perikanan. Salah satu jenis ikan konsumsi yang berpeluang untuk dibudidayakan adalah ikan nilam (*Osteochilus hasselti* C.V). (Agung et al., 2007). Sedangkan menurut Hardjamulia (1979), salah satu hambatan yang umum dialami dalam budidaya ikan adalah tidak tersedianya benih yang cukup dan berkesinambungan. Beberapa permasalahan perikanan budidaya ikan tersebut dapat diatasi dengan penerapan bioteknologi melalui rekayasa genetika.

Menurut Anonymous (2009a), saat ini, produk bioteknologi telah merasuki kehidupan sehari-hari yang mungkin jauh melebihi dari yang kita bayangkan sebelumnya. Bioteknologi didefinisikan sebagai manipulasi dan rekayasa genetika terhadap sistem atau proses biologi berdasarkan prinsip-prinsip ilmiah dengan bantuan agen biologi (Anonymous, 2009b). Sehingga, rekayasa genetika merupakan tindakan untuk memanfaatkan gen atau DNA dari suatu organisme untuk keperluan manusia dengan melalui transfer gen.

Kesuksesan transfer gen pertama kali tentang perikanan pada tahun 1985 di Cina (Zhu et al., 1985). Dan (Palmiter dan Brinster, 1985), mendefinisikan teknologi transgenik pada ikan atau hewan ternak pada umumnya adalah memasukkan DNA rekombinan yang telah dikendalikan ke dalam genom, sehingga DNA yang dimasukkan ini dapat mengembangkan salah satu aspek dari produktivitas, juga DNA dan efeknya dapat diturunkan kepada anaknya. (Gordon et al., 1980),

transgenik mungkin diartikan sebagai penyisipan DNA ke dalam gen, hal itu untuk menjaga kestabilan keturunan.

Pada umumnya ada 9 cara untuk transfer gen. 1. Metode media lemak, 2. Media kalsium fosfat, 3. Media DEAE Dextran, 4. Elektroporasi, 5. Biolistik, 6. Viral vektor, 7. Polibrin, 8. Transfeksi laser, 9. Transfer gen dengan menggunakan suhu yang ditingkatkan (Sambrook, 2001). Sedangkan menurut Sarmafilk (2002), berbagai macam teknik transfer gen seperti pengedapan kalsium, mikroinjeksi, lipofeksi, infeksi virus, elektroforasi, embrionik sel batang, transfer gen mediasi sperma, dan tembakan bom partikel.

Pada hewan perairan, mikroinjeksi adalah metode paling umum (Chourrout et al., 1986; Ozato et al., 1986; Fletcher et al., 1988). Namun menurut Beaumont (2003), penggunaan metode mikroinjeksi kurang efisien karena dapat menyebabkan kerusakan yang mempengaruhi kelangsungan hidup embrio dan dapat menghasilkan tingkat kematian yang tinggi. Sehingga alternatif yang digunakan untuk memperkecil masalah dalam teknik transfer gen adalah metode elektroporasi. Menurut Rustidja (2002), elektroporasi adalah metode yang menggunakan serangkaian getaran elektrik pendek untuk melarutkan membran sel, dengan demikian molekul DNA dapat masuk ke dalam sel. Gagne *et al.*, (1991) menambahkan, karena dengan elektroporasi pembuahan telur dapat menghasilkan jumlah 10 hingga 100 kali lebih besar daripada mikroinjeksi. Metode elektroporasi mudah digunakan dan mempunyai tingkat efisiensi yang tinggi dalam transfer gen (Nishiguchi et al. 1986).

Brackett di Amerika Serikat pada sisi lain telah menemukan metode sperma sebagai media transfer gen sebagai suatu metode baru untuk produksi hewan transgenik. Karena spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit (Handarini, 2004). Menurut Tsai (2000), beberapa manfaat dalam penerapan sperma sebagai

media teknik transfer gen pada ikan, salah satunya adalah sperma sebagai pelapor vektor dalam memasukkan DNA asing untuk menghasilkan ikan transgenik. Salah satu yang biasanya digunakan untuk reporter gen adalah Green Flourescent Protein (GFP) (Heim *et al.*, 1994). Dan kemungkinan besar digunakan sebagai reporter gen pada sel hidup. Jadi, dibandingkan dengan reporter gen yang lain, GFP ini stabil, tidak membutuhkan substrat atau uji protein untuk menghasilkan pendaran hijau (Heim *et al.*, 1994). GFP diperoleh dari Ubur-ubur (Chalfie *et al.*, 1994). GFP merupakan protein yang mengandung asam amino 238 (26,9 KDa) dari spesies ubur-ubur *Aequorea victoria*. Protein GFP menyerap cahaya biru pada puncak panjang gelombang maksimum 395 nm dan minimum 470 nm. Pada umumnya promoter yang dipakai untuk GFP fusion adalah 35S sehingga konstruk akhir menjadi p35S:gen/cDNA:GFP. Ekspresi yang muncul tersebut sering disebut dengan transient expression (ekspresi sementara) dari suatu gen (Anonymous, 2009c).

Salah satu hal yang penting dalam kegiatan transgenesis GFP pada sperma ikan nilam adalah pemilihan promoter yang berperan mengatur waktu dan lokasi dimana gen asing yang dimasukkan dapat aktif dan berekspresi. Promoter ada yang bekerja pada jaringan spesifik dan ada pula yang bekerja pada semua jaringan (Hacket, 1993). Promoter merupakan salah satu faktor penentu dalam teknologi transgenesis (Fariduddin, 2009). Menurut (Alimuddin, 2009), promoter sebagai regulator ekspresi gen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan transgenesis. Promoter yang digunakan pada penelitian ini adalah β -actin medaka, karena memiliki aktivitas tinggi pada jaringan otot.

1.2 Perumusan Masalah

- Bagaimana pengaruh kuat medan listrik 40 (V/cm), lama kejutan (*pulse length*) 0,5 ms dan 1 ms, serta jumlah kejutan (*pulse number*) 2x, 4x, 6x

terhadap integrasi gen pm β -Actin – hrGFP pada sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*)?

- Apakah GFP dengan promoter *Beta actin medaka* bisa terkespresi pada sperma,embrio dan larva ikan nilem (*Osteochillus hasselti*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kuat medan listrik 40 V/cm, lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) terhadap pergerakan (motilitas) sperma, kemampuan hidup (viabilitas) sperma, kemampuan sperma membuahi telur (fertilitas) serta gambaran ekspresi gen GFP pada sperma, embrio dan larva ikan nilem (*Osteochilus hasselti*).

1.4 Hipotesis

Ho : Diduga pemberian kuat medan listrik 40 V/cm dengan lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) yang berbeda tidak akan mempengaruhi efektifitas ekspresi gen pm β -Actin – hrGFP pada sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*)

H1 : Diduga pemberian kuat medan listrik 40 V/cm dengan lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) yang berbeda akan mempengaruhi efektifitas ekspresi gen pm β -Actin – hrGFP pada sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*)

1.5 Kegunaan penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan akan dapat memberikan pengetahuan dan informasi mengenai penggunaan GFP yang efektif sebagai reporter gen serta penggunaan kuat medan listrik, lama kejutan dan jumlah kejutan yang tepat dalam metode transfer gen berdasarkan metode elektroporasi.

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 mulai bulan September 2010 sampai April 2011.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan nilem (*Osteochilus hasselti*)

2.1.1 Klasifikasi Ikan Nilem

Menurut Susanto (2005), bentuk tubuh ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) hampir serupa dengan ikan mas. Bedanya, kepala ikan nilem relatif lebih kecil. Pada sudut-sudut mulutnya, terdapat dua pasang sungut peraba. Warna tubuhnya hijau abu-abu. Sama halnya dengan pendapat Djuhanda (1985), bahwa ikan nilem adalah salah satu spesies ikan yang masuk dalam famili *Cyprinidae*, sehingga bentuk tubuh ikan nilem hampir serupa dengan ikan mas, hanya kepalanya relative lebih kecil. Pada sudut-sudut mulutnya terdapat dua pasang sungut-sungut peraba.

Ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) menurut Saanin (1968), diklasifikasikan dalam:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Craniata
Class	: Pisces
Subclass	: Actinopterygi
Ordo	: Ostariophysii
Subordo	: Cyprinoidae
Famili	: Cyprinidae
Genus	: <i>Osteochilus</i>
Species	: <i>Osteochilus hasselti</i>



Gambar 2.1 Ikan Nilem (Makmur, 2009)

2.1.2 Morfologi dan Biologi Ikan Nilem

Nilem (*Osteochilus hasselti*) banyak dipelihara terutama oleh peternak di Sumatera (khususnya Sumatera Barat) dan di daerah Priangan Jawa Barat). Di habitat aslinya, ikan ini banyak ditemukan hidup liar di perairan umum terutama di sungai-sungai yang berarus sedang dan berair jernih (Anonymous, 2009). Ikan Nilem memiliki popularitas sedikit dibawah ikan mas. Di berbagai daerah lain, ikan ini dikenal sebagai ikan lehat, regis, monto, palong, palouw, pawas, assang, atau penopa (Susanto, 2005). Sedangkan menurut (Achjar, 1986), nilem di berbagai daerah di Indonesia memiliki nama-nama yang berbeda seperti : mellem, molem, monto, muntu, wader, lehat, mramas, mangut, nelem, palau, palong, dan pawas. Ikan ini terdapat di Jawa, Sumatera dan Kalimantan, Malaysia, dan Thailand.

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 relatif 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 (Djajadiredja, 1990).

Menurut Effendie (1979), berat rata-rata dan panjang total untuk ikan nilem diantaranya; Berat rata-rata induk betina 200,7 gram, panjang total rata-rata induk betina 28,7 cm, dan Berat rata-rata induk jantan 187,3 gram, panjang total rata-rata induk jantan 28,2 cm.

2.1.3 Ciri-ciri Ikan Nilem jantan yang Matang Gonad

Menurut Sumantadinata (1981), ciri ikan jantan yang sudah matang kelamin yaitu mudah mengeluarkan sperma (milt) jika perutnya diurut (*stripping*), naluri gerakannya lincah, postur tubuh dan perut ramping, warna tubuh kehijauan dan kadang gelap, lubang urogenital agak menonjol serta sirip dada kasar dan perutnya keras. Sedangkan menurut Susanto (2005), 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.

2.1.4 Ciri-ciri Ikan Nilem Betina Yang Matang Gonad

Menurut Sumantadinata (1981), ikan betina matang kelamin dicirikan dengan perut yang relatif membesar dan lunak bila diraba, dari lubang genital keluar cairan jernih kekuningan, naluri gerakan lambat, postur tubuh gemuk, warna tubuh kelabu kekuningan, dan lubang genital berbentuk bulat telur agak melebar dan membengkak. Sedangkan ciri ikan jantan yang sudah matang kelamin yaitu mudah mengeluarkan sperma (milt) jika perutnya diurut (*stripping*), naluri gerakannya lincah, postur tubuh dan perut ramping, warna tubuh kehijauan dan kadang gelap, lubang urogenital agak menonjol serta sirip dada kasar dan perutnya keras. 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 (Susanto, 2006).

Ovulasi adalah proses keluarnya sel telur (oosit) yang telah matang dari folikel dan masuk kedalam rongga ovarium atau rongga perut (Gusrina, 2008). Pelepasan telur terjadi akibat; telur membesar, adanya kontraksi aktif dari folikel (bertindak sebagai otot halus) yang menelan sel telur keluar, daerah tertentu pada folikel melemah, membentuk benjolan hingga pecah dan terbentuk lubang pelepasan hingga telur keluar (enzim yang berperan dalam pemecahan dinding

folikel: protease iplasmin kemudian diikuti oleh hormon prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) atau chotechomlamin yang merangsang kontraksi aktif dari folikel)

2.2 Morfologi Sperma Ikan

Sperma didefinisikan oleh Harvey dan Hoar (1979), sebagai larutan spermatozoa yang berada dalam larutan seminal dan dihasilkan oleh hidrasi testes, atau salah satu bagian dari alat reproduksi ikan.

Bentuk sperma ada yang normal ada pula yang tidak normal. Dibawah ini adalah bentuk sperma yang abnormal menurut Wongso (2007) ; Makro : 25 % > kepala normal, Mikro : 25 % <, Taper kurus, lebar kepala $\frac{1}{2}$ yang normal, tidak jelas batas akrosom, memberi gambaran cerutu, Piri : memberi gambaran "tetesan air mata", Amorf ; Bentuk kepala yg ganjil, permukaan tidak rata, tidak jelas batas akrosom, Round : Bentuk kepala seperti lingkaran, tidak menunjukkan akrosom, Piri ; tidak jelas adanya kepala yg nyata, tampak midpiece dan ekor saja, Cytoplasmic droplet ; menempel pada kepala atau midpiece, lebih cerah, Ekor abnormal : pendek / spiral / permukaan tidak halus / ganda.

Sperma meliputi dua bagian, yaitu zat cair dan sel. Cairan merupakan tempat hidup sperma. Sel-sel yang hidup dan bergerak disebut spermatozoa, dan zat cair dimana sel-sel tersebut berenang seminal (Partodihardjo, 1987). Ditambahkan oleh Toelihere (1981), spermatozoa terdiri dari dua bagian, yaitu kepala dan ekor. Tetapi ada pula spermatozoa yang memiliki tiga bagian, yaitu kepala, ekor dan tengah, walaupun ukuran dan bentuk spermatozoa berbeda pada berbagai jenis hewan namun struktur morfologinya sama, yaitu terdiri dari kepala, bagian tengah dan ekor. Sedangkan menurut Ravensong (2001), sebuah sel sperma memiliki tiga bagian, yaitu : kepala, badan dan ekor. Badannya hanya mengandung sejumlah protein yang mengikat kepala dan ekor bersama-sama. Kepalanya seperti sel tubuh pada umumnya, kecuali ia tidak mengandung

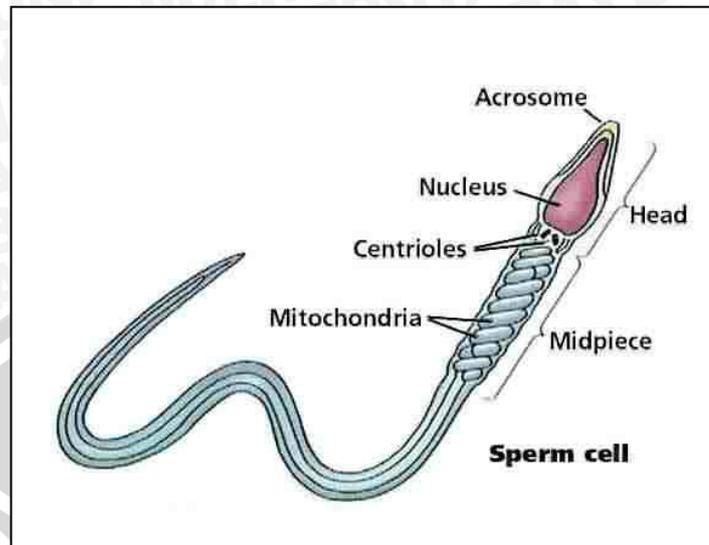
organella, hanya DNA. Memiliki membran sel yang terbentuk atas fosfolipid dengan sejumlah protein yang menyusun strukturnya. Bagian paling penting adalah akrosom yang memiliki sebuah filamen dari protein aktin. Bagian ini akan mengikat pada reseptor di permukaan telur.

Ekor sperma terdiri atas tiga bagian yaitu *middle piece*, *principal piece* dan *end piece*. Ekor ini berfungsi untuk pergerakan menuju sel telur. Ekor yang motil itu pada pusatnya sama seperti flagellum memiliki struktur axoneme yang terdiri atas mikrotubul pusat dikelilingi oleh Sembilan doublet mikrotubul yang berjarak sama satu dengan yang lainnya. Daya yang dihasilkan mesin ini memutar ekor bagaikan baling-baling dan memungkinkan sperma meluncur dengan cepat. Keberadaan mesin pendorong ini tentunya membutuhkan bahan bakar yang paling produktif yaitu gula fruktosa yang telah tersedia dalam bentuk cairan yang melingkupi sperma (Anonymous, 2006). 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 ; Soparna, 1980).

Pada penelitian Silviera *et al.* (2006) , bahwa pada ikan *Brycon cephalus* memiliki konsentrasi sperma $9.617 \pm 1.630 \times 10^6$ spermatozoa/mm³ . Sedangkan ukuran morfologi spermatozoa yaitu panjang total spermatozoa = $31,288 \pm 4,47 \mu\text{m}$, lingk kepala (panjang = $1,727 \pm 0,18 \mu\text{m}$, lebar = $1,752 \pm 0,17 \mu\text{m}$), bagian tengah (badan) = $2,561 \pm 0,44 \mu\text{m}$, dan panjang ekor = $29,521 \pm 4,37 \mu\text{m}$. Morfologi sperma bisa dilihat pada gambar 2.2 di halaman berikut.

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. Bagian akrosom sperma terdapat nukleus, yang bagian luar dan

dalamnya dikelilingi membran plasma (Oko *et al.*, 1998). Morfologi spermatozoa bisa diamati pada gambar dibawah.



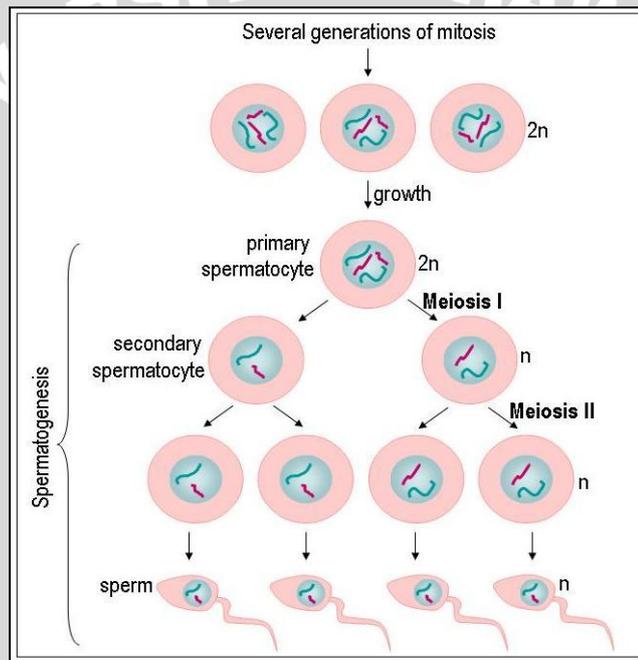
Gambar 2.2 Anatomi spermatozoa

2.2.1 Proses Pembentukan Spermatozoa

Sperma adalah sel yang diproduksi oleh organ kelamin jantan dan bertugas membawa informasi genetik jantan ke sel telur dalam tubuh betina. Spermatozoa berbeda dari telur yang merupakan sel terbesar dalam tubuh organisme adalah gamet jantan yang sangat kecil ukurannya dan mungkin terkecil. Spermatozoa secara struktur telah teradaptasi untuk melaksanakan dua fungsi utamanya yaitu menghantarkan satu set gen haploidnya ke telur dan mengaktifkan program perkembangan dalam sel telur (Sistina, 2000).

Menurut Sumantadinata (1983), testes ikan berbentuk memanjang dalam rongga badan dibawah gelembung renang diatas usus. Jaringan pengikat yang disebut mesentrium menempelkan testes ini pada bagian rongga badan bagian depan gelembung renang. 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 pembentukan sperma dapat dilihat pada gambar dibawah.



Gambar 2.3 Proses Pembentukan Spermatozoa

Secara struktur spermatozoa dicirikan sebagai sel yang “terperas”, sangat sedikit sekali kandungan sitoplasmanya. Spermatozoa memiliki organel-organel yang sangat sedikit dibandingkan sel lainnya. Spermatozoa tidak memiliki ribosom, retikulum endoplasmik dan golgi. Sebaliknya spermatozoa memiliki banyak sekali mitokondria yang letaknya sangat strategis untuk pengefisiensi energi yang diperlukan. Secara struktur ada dua bagian yaitu kepala dan ekor (Soeminto, 1993).

Kepala spermatozoa bentuknya bervariasi. Isinya adalah inti (di dalamnya terkandung material genetik) haploid yang berupa kantong berisi sekresi-sekresi enzim hidrolitik. Spermatozoa yang kontak dengan telur, isi akrosomnya dikeluarkan secara eksositosis yang disebut dengan reaksi akrosom (Sistina, 2000).

Ekor sperma terdiri atas tiga bagian yaitu *middle piece*, *principal piece* dan *end piece*. Ekor ini berfungsi untuk pergerakan menuju sel telur. Ekor yang motil itu pada pusatnya sama seperti flagellum memiliki struktur axoneme yang terdiri atas mikrotubul pusat dikelilingi oleh Sembilan dobel mikrotubul yang berjarak sama satu dengan yang lainnya. Daya yang dihasilkan mesin ini memutar ekor bagaikan baling-baling dan memungkinkan sperma meluncur dengan cepat. Keberadaan mesin pendorong ini tentunya membutuhkan bahan bakar yang paling produktif yaitu gula fruktosa yang telah tersedia dalam bentuk cairan yang melingkupi sperma (Anonymous, 2006).

2.2.2 Kandungan Biokimiawi Sperma

Menurut Toelihere (1985), plasma semen memiliki pH sekitar 7,0 dan tekanan osmotik sama dengan darah (yaitu ekuivalen dengan 0,9% natrium chlorida). Secara biokimiawi, sperma mengandung persenyawaan-persenyawaan organik spesifik seperti fruktosa, asam sitrat, sorbitol, inositol, glycerylphosphorylcholine (GPC), ergothioneine dan prostaglandin. Persenyawaan-persenyawaan ini dihasilkan oleh berbagai kelenjar pelengkap atas pengaruh testosteron dari testes. Plasma semen mengandung bahan-bahan penyangga dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa baik yang dipergunakan secara langsung (misalnya fruktosa dan sorbitol) maupun yang tidak langsung misalnya GPC.

Menurut Billard (1978), komposisi organik milt (seminal plasma) dari ikan lele dan ikan mas 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. Soehartojo (1995) menambahkan, bahwa bahan utama yang dipakai spermatozoa sebagai sumber energi dari luar testis adalah fruktosa yang diubah menjadi asam laktat dan energi dengan enzim fruktolisin.

Pemberian larutan fruktosa sebagai pengencer untuk spermatozoa ikan dimaksudkan untuk memberikan energi dan nutrisi untuk spermatozoa ikan agar dengan energi yang berupa ATP tersebut dapat meningkatkan atau memperpanjang waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa. Sesuai pendapat Teolihere (1981), fruktosa merupakan turunan karbohidrat yang dapat dijadikan sumber energi untuk mendukung pergerakan (motilitas) dan ketahanan spermatozoa. Sedangkan Hidayaturohman (2007) mengatakan dibawah kondisi Aerob, metabolisme fruktosa adalah



Ketika ada oksigen, metabolisme fruktosa adalah 9 kali lebih efisien dalam menghasilkan energi. Total energi dari 38 ATP adalah 266.000 kalori. Ketika terdapat O_2 yang cukup, molekul fruktosa dimetabolisir secara sempurna menjadi CO_2 dan air.

2.2.3 Motilitas sperma

Spermatozoa bersifat immotil dalam cairan plasmanya, dan akan bergerak apabila bercampur dengan air. Gerakan 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 (Fujaya, 2004).

Menurut Soeparna (1980), pergerakan spermatozoa memerlukan energi seperti halnya pada sel-sel hidup lainnya. Menurut Soehartojo (1995) bahan utama yang dipakai spermatozoa sebagai sumber energi dari luar testis adalah fruktosa yang diubah menjadi asam laktat dan energi dengan enzim fruktolisin. Faktor kedua diduga terjadinya peningkatan waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa tersebut, adalah bahwa fruktosa dapat meningkatkan aktifitas protein yang terdapat pada ekor spermatozoa. Beberapa ahli mengatakan bahwa bagian tengah ekor spermatozoa disusun oleh mikrotubulus yang mengandung substansi fiber yang disusun oleh protein dinein. Menurut Zaneveld (1978), protein dinein ini penting karena mempunyai aktivitas ATP-ase. Menurut Toliehere (1985), ATP-ase akan lancar dan menyebabkan peningkatan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Energi untuk motilitas sperma berasal dari perombakan *Adenosin Triphosphat* (ATP) di dalam selubung mitokondria melalui penguraian reaksi-reaksi pengurainya menjadi *Adenosin Diphosphat* (ADP) dan *Adenosin Monophosphat* (AMP)

Sedangkan menurut Wira (2007), lamanya bergerak sperma dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu umur, suhu, tingkat kematangan dan faktor alam lainnya seperti kandungan ion, pH serta osmolitas. Motilitas sperma sangat bergantung terhadap lingkungan dan proses preservasi, pembekuan yang cepat dapat melindungi sperma dari kerusakan akibat efek larutan, tetapi dapat mengakibatkan *cold shock* dan pembentukan kristal es yang akan merusak sperma. Pergerakan spermatozoa dapat dipakai sebagai indikator kualitas spermatozoa, walaupun belum dapat menjamin terjadinya pembuahan yang berhasil (Harvey dan Hoar, 1979).

2.2.4 Viabilitas Sperma

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

Kelangsungan hidup sperma ikan dapat dipertahankan pada suhu 0-4°C dengan menyediakan udara atau oksigen yang cukup pada sampel semen. Pada penyimpanan sperma ikan kerapu (*E. Malabaricus*) dengan pembekuan menggunakan 10% DMSO diperoleh motilitas sperma tetap memberikan hasil yang baik setelah penyimpanan selama 10 hari (Chao *et al.*, 1992).

Kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan lebih tinggi viabilitasnya dalam suhu rendah. Penurunan suhu dari suhu kamar ke suhu dingin dan suhu beku perlu dilakukan secara bertahap untuk menghindari *coldshock* (Rustidja, 2000).

Pada pengamatan sperma yang hidup dan yang mati digunakan pewarnaan eosin negrosin. Menurut Toelihere (1985), apabila sperma mati, permeabilitasnya meninggi, terutama disekitar pangkal kepala. Hal ini terjadi karena membran plasma masih berfungsi baik. Pernyataan ini didukung pula oleh Arifiantini *et al.* (2005), bahwa prinsip dasar dari pewarnaan ini adalah karena adanya perbedaan aktifitas zat warna antara spermatozoa yang mati dan hidup. Sperma yang telah mati permeabilitas membran menjadi tinggi akibatnya akan mudah terjadi penyerapan warna, akibat membran plasma yang sudah kehilangan fungsinya.

2.2.5 Larutan Buffer sperma

Menurut Toelihere (1985), dalam metabolisme sperma, reaksi-reaksi yang menghasilkan energi di dalam semen hanya berlangsung pada spermatozoa.

Energi untuk motilitas sperma berasal dari perombakan Adenosin Triphospat (ATP) di dalam selubung kitokondria melalui penguraian reaksi-reaksi penguraiannya menjadi Adenosin Diphospat (ADP) dan Adenosin Monophospat (AMP) :



Sekurang-kurangnya ditemukan empat bahan organik di dalam semen yang dapat dipakai secara langsung atau tidak langsung oleh sperma sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup dan motilitasnya. Bahan-bahan tersebut adalah fruktosa, sorbitol, GPC dan plamalogen. Asam laktat menumpuk di dalam semen sebagai hasil metabolisme sperma. Derajat pengikatan dan pemakaian fruktosa oleh spermatozoa optimal pada pada suatu medium dengan pH 6 sampai 8, isotonik dengan semen. Pada umumnya, sperma sangat aktif dan tahan hidup lama pada pH sekitar 7. Motilitas parsial dapat dipertahankan pada pH antara 5 dan 10. Walaupun sperma segera dimobilisasi oleh kondisi-kondisi asam, pada beberapa spesies motilitas dipulihkan kembali apabila pH dikembalikan ke netral dalam waktu satu jam. Pada sperma domba dan sapi menghasilkan asam laktat dalam jumlah yang tinggi dan metabolisme fruktosa plasma seminalis, sehingga penting untuk memberikan unsur penyangga seperti garam-garam phospat, sitrat dan bikarbonat didalam medium (Tolihere, 1985).

Larutan penyangga atau larutan buffer merupakan suatu larutan yang dapat mempertahankan nilai pH tertentu. Adapun sifat yang paling menonjol dari larutan penyangga ini seperti pH larutan penyangga hanya berubah sedikit pada penambahan sedikit asam kuat. Disamping itu, larutan penyangga merupakan larutan yang dibentuk oleh reaksi suatu asam lemah dengan basa konjugatnya ataupun oleh basa lemah dengan asam konjugatnya. Reaksi ini disebut sebagai

reaksi asam-asam konjugat. Disamping itu mempunyai sifat berbeda dengan komponen-komponen pembentuknya (Kamila, 2009).

2.3 Sperma Media Transfer Gen

Sperma sebagai media transfer gen yang dapat dikembangkan sebagai salah satu teknik transfer gen yang menguntungkan karena prosedurnya alamiah. Spermatozoa dapat mengikat DNA dan membawa sampai ke telur. Pada penanganan lain sperma ikan dapat disimpan, yang mana teknik ini menjadi harapan baru dalam teknik transfer gen (Samarfilk, 2002).

Penggunaan sperma sebelum fertilisasi mempunyai keuntungan lain dibandingkan metode transgenik lainnya (Kurita *et al.*, 2009). Sedangkan menurut sin *et al.* (2008), sperma sebagai media transfer gen sangat potensial dikembangkan dalam transgenik ikan karena prosedurnya yang relatif alami dan efisien. Karena sperma menurut Gandolfi *et al.* (1989), merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing kedalam oosit. Metode sperma sebagai media transfer gen ditemukan oleh Brackett. Selain itu, sperma juga dapat mengambil DNA asing dari medium luar (Andreeva *et al.*, 2003).

Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen ke dalam telur ikan zebra (Khoo *et al.*, 1992). Selain itu, 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 peningkatan keberhasilan transfer gen pada *common carp*, *African catfish*, dan *tilapia* (Muller *et al.*, 1992). Menurut koo *et al.* (1993), dari pengamatan mikroskop elektron, menunjukkan bahwa DNA asing dapat masuk dalam inti sperma, yaitu dimana DNA masuk ke dalam kepala sperma.

Penggunaan sel sperma sebagai vektor transfer gen memiliki fokus yang luas dalam metode untuk memaksimalkan efisiensi transfer DNA, terutama menjaga viabilitas sperma setelah transfer. Walaupun pengikatan DNA dapat terjadi dengan menginkubasi sperma dan DNA secara bersamaan, namun efisiensi pengikatan sperma dan DNA dapat ditingkatkan dengan menggunakan elektroporasi (Squires,1998).

2.4 Metode Elektroporasi

Metode elektroporasi telah menjadi metode yang populer dalam mentransfer gen asing ke dalam embrio atau sperma dari organisme akuatik beberapa tahun yang lalu. Elektroporasi merupakan sebuah metode untuk memasukkan DNA asing kedalam sel bakteri, khamir, tanaman dan binatang (Shigekawa and Dower, 1988) . Elektroporasi menggunakan serangkaian kejutan elektrik pendek untuk mendorong terbentuknya pori-pori sementara pada fosfolipid bilayer dari membran sel. Dengan cara demikian memungkinkan masuknya molekul DNA ke dalam sel. Setelah kejutan listrik, pori-pori dari sel membran menjadi tertutup kembali (Nakamura, 2009). Sel dapat membuka sementara oleh perbedaan potensial membran yang disebabkan oleh pengaplikasian tegangan listrik (Golzio *et al.*, 1998).

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

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.

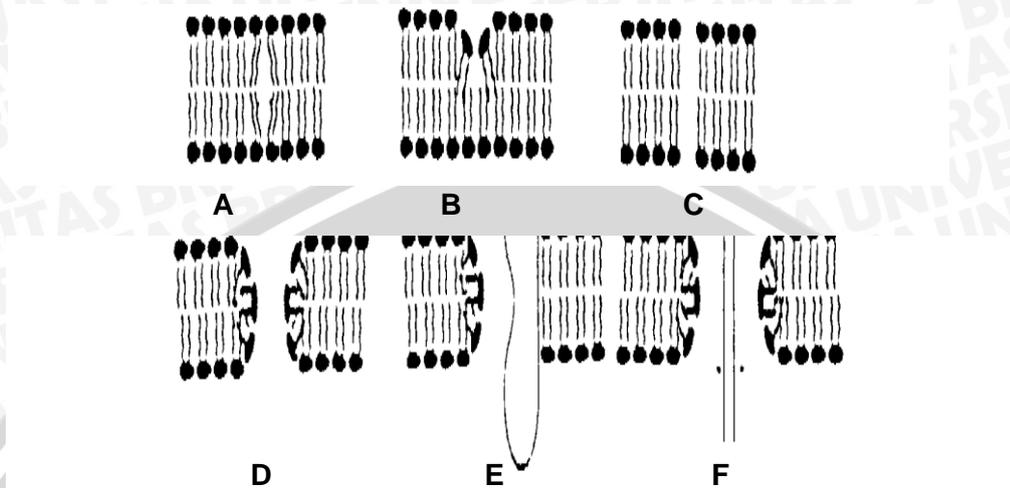
Prinsip fisika yang penting dalam elektroporasi antara lain:

1. Penggunaan kejutan listrik dengan besaran optimal dan lamanya kejutan dapat menginduksi sementara keadaan permeabilitas pada sel yang diberi kejutan listrik (Neumann *et al.*, 1982).
2. Pada penggunaan kejutan listrik dapat mengubah partikel di dalam media yang mengandung ion oleh elektroporasi (Moyer, 1936).
3. Arus listrik dibutuhkan untuk mempertahankan kejutan listrik pada media yang mengandung listrik (hukum ohm) (Hayt, 1974).
4. Panas yang dihasilkan dari arus listrik pada media yang mengandung ion sebanding dengan arus (Hukum joule)

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

Terbentuknya sebuah pori pada membran terjadi apabila energi yang tersimpan di dalam kapasitor membran melebihi energi yang dibutuhkan membran untuk menjaga agar pori tidak pecah. Energi (E_p) untuk membuat pori dari jari-jari (r) yang telah ditentukan dalam membran dipengaruhi oleh keseimbangan antara garis tegangan (γ) pada pinggiran pori dan tegangan permukaan membran (Γ) dengan rumus ; $E_p = 2 \pi r \gamma - \pi r^2 \Gamma$

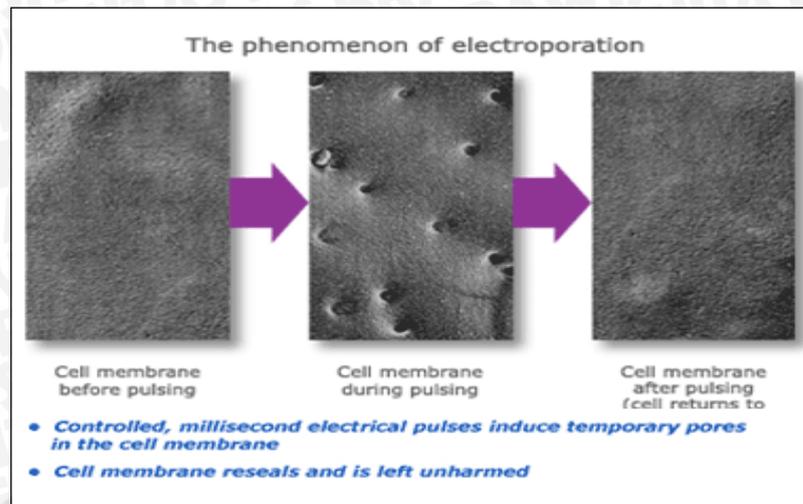
Untuk mengetahui proses terbentuknya pori-pori pada membran sperma dengan penerapan elektroporasi, bisa diamati pada ilustrasi dibawah



Gambar 2.4 Ilustrasi proses terbukanya sementara membran dan penyusunan ulang selama elektroporasi (Weaver, 1996)

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

Tegangan yang diberikan untuk membuka membran 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). Gambar berikut menunjukkan elektroporasi dengan lama kejutan milidetik yang membuat pori-pori membran sel membuka sementara. Setelah jangka waktu yang sangat pendek.



Gambar 2.5 Proses membukanya membran selama elektroporasi (Weaver, 1996)

Energi pori mencapai maksimum ketika nilai kritis dari jari-jari pori $r_c = \gamma / \Gamma$ (1,2). Besar garis tegangan pada pinggiran pori tergantung pada penutupan molekul pada membran. Pori-pori dengan jarak $< r_c$, cenderung menutup, sedangkan pori-pori dengan jarak $> r_c$ cenderung akan melebar. Membran akan kendur jika dialiri medan listrik (E), maka pengisian pada kapasitor membran akan setara, sehingga energi yang tersimpan pada kapasitor membran dapat melalui area yang telah ditandai pada pori dimana persamaannya adalah:

$$E_c = \pi r^2 \epsilon_0 (\epsilon_w - \epsilon_m) V^2 / 2d \quad (2)$$

Dimana E merupakan dielektrik konstan dan 0, w (air) dan m (membran) berturut-turut ialah ruang kosong. V ialah voltase membran (energi potensial membran) besarnya ditentukan oleh lapisan medan getar yang melewati membran d . Pada membran, jari-jari elektropore akan terbentuk jika energi listrik E_c diberikan ke E_q . (2) lebih besar dari energi E_p yang dibutuhkan untuk membentuk pori-pori ukuran tertentu. Energi ini diartikan sebagai penurunan voltase V_b , melalui membran yang akan mengalami penurunan dan diameter r pori-pori akan terbentuk. Jika $r < r_c$, tegangan listrik dapat diubah-ubah. Sehingga pori-pori akan segera melebar ketika setelah terbentuk. Hubungan

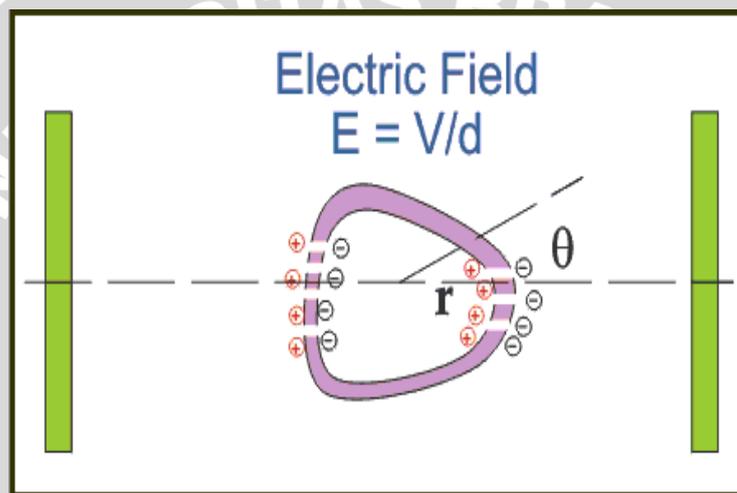
makroskopik telah dijelaskan oleh Zhelv dan Needham (2). Dengan melihat dari kasus sederhana sel yang berbentuk bola, pengaturan tegangan dari interior sel jauh lebih banyak daripada sel membran. Energi potensi membran potensial yang ditentukan, atau tegangan antar membran V oleh sel dinyatakan dengan persamaan:

$$V = 1,5 a E \cos \theta [1 - \exp (-t/ \pi)] \quad (3)$$

Dimana E ialah getar medan listrik, a adalah jari-jari sel, dan θ adalah sudut antara arah medan dan vektor radial dari titik permukaan dimana ditemukan energi potensial membran. Besaran waktu relaksasi π membran ditentukan oleh daya konduksi dari dalam dan luar sel (3). V terbesar ketika kutub berlawanan arah atau searah dengan arah medan, dimana berturut-turut θ adalah 0 dan π . Ketika terjadi penurunan tegangan sebesar (V_b) pada biomembran sebesar $1 V$, maka untuk sel dengan diameter $10 \mu m$ dan dengan getar $0,7 kV/cm$ sudah cukup untuk menghasilkan penurunan energi potensi tegangan pada kutub. Dengan menentukan kenaikan besarnya medan, potensi penurunan energi pada membran menjauh dari kutub, sebagai contoh semakin luasnya daerah yang mengalami penurunan tegangan. Persentase daerah yang mengalami penurunan ditunjukkan oleh rumus $(1 - E_b/E)$ dimana E_b adalah besaran medan getar yang dibutuhkan untuk memproduksi penurunan tegangan pada membran V_b (Hui, 1996).

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, hal ini digambarkan pada ilustrasi berikut ini.

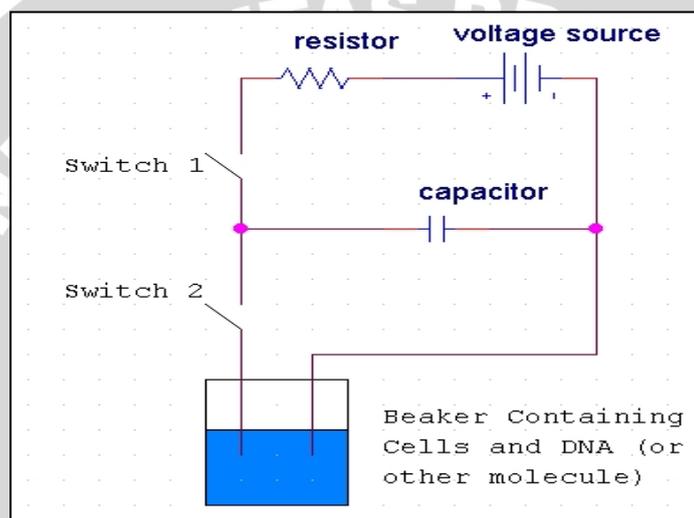


Gambar 2.6 Medan Listrik saat Elektroporasi (Weaver, 1996)

Peningkatan tegangan listrik dari salah satu kutub yang lebih besar dari kutub kutub lainnya, sehingga 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)

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 elektrik 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 elektrik dan difusi. Kekuatan elektrik muncul dari adanya daya tarik antar partikel yang berlawanan dengan perubahan elektrik (positif dan negatif) dan daya tolak menolak antara partikel yang sejenis (keduanya positif atau keduanya negatif).



Gambar 2.7 Rangkaian dasar tegangan listrik yang digunakan untuk elektroporasi (melcher, 2000).

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).

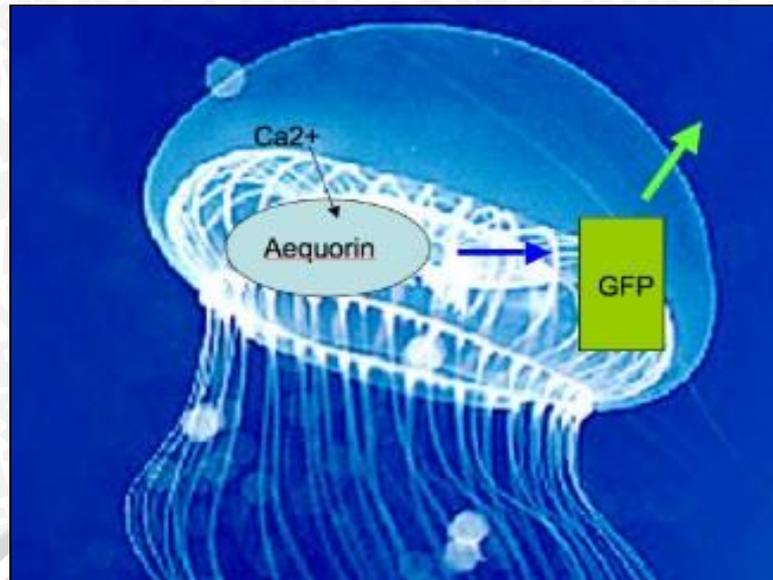
Dalam suatu bahan, jika ada pengaruh dari luar sehingga menyebabkan elektron-elektron bergerak ke satu arah, maka dikatakan terjadi arus listrik yang arahnya berlawanan dengan arah gerakan elektron-elektron tadi. Arus listrik

didefinisikan sebagai kecepatan aliran muatan listrik. Arus sebesar 1 ampere adalah aliran muatan listrik sebanyak 1 coulomb/detik (Zhanggischan *et al.*, 2004).

2.5 GFP Sebagai Marker Biologi

Green fluorescent protein (GFP) adalah protein berpendar alami yang diisolasi dari ubur-ubur *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962). GFP mengubah protein kimia berpendar biru lain, luciferase menjadi cahaya hijau berpendar (Morin and Hastings, 1971; Ward, 1979). Sejak awal ditemukannya GFP dalam ubur-ubur, protein terbungkus ini telah ditemukan dalam laut, bentuk warna, jika bukan berpendar, pigmen-pigmen (Matz *et al.*, 2002) protein yang sama juga ditemukan pada mamalia dalam bentuk komponen ruang membran ekstraselular dinamakan nidogen (Hopf *et al.*, 2001).

Green Fluorescent Protein (GFP) dari ubur-ubur (*Aequora Victoria*) mempunyai beberapa manfaat penting. Ekspresi gen ini dapat dideteksi pada saat itu juga, dalam sel hidup dan organisme sederhana (Cubitt *et al.*, 1995). Umumnya DNA mempunyai 2 fungsi utama yaitu untuk menyandi protein atau sebagai elemen struktural dan sekuen pengatur transkripsi (Hackett, 1993). Gen GFP (*Green Fluorescent Protein*) adalah gen berpendar hijau yang diisolasi dari *Aequorea victoria* (Felts *et al.*, 2001), gen ini memiliki kandungan protein yang dapat berpendar dan divisualisasikan ekspresinya pada sel dengan menggunakan bantuan sinar UV atau mikroskop fluorescent (Iyengar *et al.*, 1996). GFP memiliki kelebihan yaitu untuk mendeteksi ekspresinya tidak memerlukan substrat tambahan, sehingga dapat digunakan sebagai *marker* (penanda) dalam pengujian efektivitas suatu promoter (Yazawa *et al.*, 2005), Lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar di halaman berikut.



Gambar 2.8 Ubur-ubur dari klas *Aequorea Victoria*
conncol.edu/ccaacd/zimmer/gfp-ww/tsien.html

GFP dapat juga berperan sebagai gen target dalam pembuatan ikan hias berpendar yang berwarna-warni (Gong *et al.*, 2002). Jenis gen GFP lainnya yang juga digunakan sebagai gen penanda yaitu yang diisolasi dari Anthozoa (soft coral) jenis *Renilla reniformis* yaitu gen hrGFP (*Humanized Renilla reniformis Green Fluorescent Protein*) (Felts *et al.*, 2001).

Proses integrasi DNA dengan 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 amplitud yang diperlukan yang mana untuk menjaga lamanya waktu kejutan kemudian dikembalikan ke nol. Sedangkan eksponensial wave, tegangan ditujukan untuk suatu amplitud yang diinginkan, kemudian memberikan pembukaan pori-pori yang eksponen (Muller *et al.*, 1992).

2.6 Promoter β -actin medaka

Salah satu hal yang penting dalam kegiatan transgenesis adalah pemilihan promoter yang berperan mengatur waktu dan lokasi dimana gen asing yang dimasukkan dapat aktif berekspresi. Promoter ada yang bekerja pada jaringan spesifik dan ada pula yang bekerja pada semua jaringan (Hackett, 1993).

Promoter adalah sekuen DNA yang memfasilitasi transkripsi gen tertentu. Agar transkripsi berlangsung, enzim yang mensintesis RNA yang dikenal sebagai RNA Polymerase harus mengikat DNA dekat gen. Promotor mengandung sekuen DNA spesifik dan segmen-segmen yang menyediakan tempat untuk mengikat RNA polymerase dan protein yang disebut faktor transkripsi sebagai calon RNA Polymerase (Anonymous, 2009g). Sedangkan menurut Rustidja (2002), promotor dipertimbangkan sebagai sequence DNA dekat tempat inisiasi transkripsi sebagai tempat RNA polimerase melekat, didalamnya terdapat 40-100 pasangan basa yang berguna untuk mengawali sintesa dari mRNA. Tempat lain dalam elemen regulator, DNA operator yang berperan untuk menguatkan dan menekan transkripsi. Promotor dan *enhancer / silencer site* (operator) adalah *cis acting*, yang mempengaruhi transkripsi pada segmen yang sama dari DNA (DNA disampingnya). Aktivitas transkripsi tergantung pada ketersediaan dari *trans action protein factor* dalam type sel khusus yang akan menguatkan atau menekan transkripsi. Promoter merupakan salah satu faktor penentu dalam teknologi transgenesis (Fariduddin, 2009). Menurut Alimuddin (2009), promoter sebagai regulator ekspresi gen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan transgenesis. Promoter β -actin memiliki aktivitas tinggi pada jaringan otot.

Banyaknya jenis promoter dapat dievaluasi pada ikan transgenik dan sangat berbeda pada kemampuannya untuk membantu ekspresi dari DNA asing. Diantaranya Cytomegalovirus (CMV), *Rous sarcoma virus long terminal repeat*

(RSV-LTR), β -actin dan chicken δ -crystallin merupakan promoter yang membantu ekspresi DNA asing di *host* spesies. Mouse metallothionein (MT) dan rainbow-trout MT adalah promoter yang membantu berekspresi pada ikan transgenik (Dunham, 2004).

Actin kaya akan protein *cytoskeletal* di sel eukaryotic dan sedikitnya ada enam isoform utama yang dapat diidentifikasi pada vertebrata. Isoform tersebut dapat dibagi lagi kedalam tipe jaringan otot dan tipe jaringan bukan otot. Actin isoform merubah sedikit di rangkaian asam amino tapi selama berkembang perbedaan tersebut dapat diatur (Quitschket *et al.*, 1988).

Promoter β -actin memiliki beberapa sifat yang terkait dengan aktivitas elemen-elemennya yaitu *constitutive*, *ubiquitous* dan *house keeping* (Volckaert, 1994). *Constitutive* berarti promoter ini mampu aktif tanpa membutuhkan faktor pemicu seperti rangsangan hormon atau rangsangan suhu. Promoter β -actin bersifat *ubiquitous* (terdapat dimana-mana) artinya dapat aktif pada semua jaringan otot. Sedangkan bersifat *house keeping* berarti promoter β -actin dapat aktif kapan saja bila diperlukan (Purwanti, 2007).

2.7 Confocal Laser Scanning Microscopy

Berdasarkan kegiatan pengamatan yang dilakukan, mikroskop dibagi menjadi 2 bagian, yaitu mikroskop sederhana (yang umumnya digunakan pelajar) dan mikroskop riset (mikroskop dark-field, fluoresens, fase kontras, Nomarski DIC, dan konfokal) (Anonymous, 2009d).

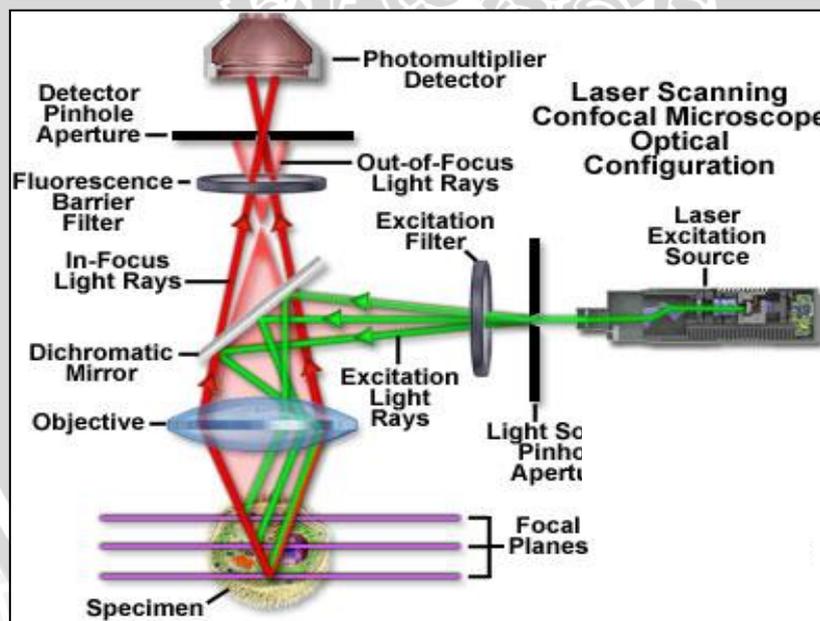
Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM atau LSCM) adalah teknik untuk mendapatkan resolusi tinggi pada gambar optik dengan kedalaman yang selektif. Kunci keistimewaan *confocal microscopy* adalah kemampuannya untuk mendapatkan gambar yang fokus dari kedalaman yang dipilih, sebuah proses yang dikenal sebagai *optik sectioning*. Gambar diperoleh titik demi titik (point by

point) dan kemudian direkonstruksi dengan komputer, membiarkan rekonstruksi tiga dimensi dari objek *topologically* kompleks. Prinsip confocal microscopy ini awalnya dipatenkan oleh Marvin Minsky pada tahun 1957, tetapi butuh tiga puluh tahun dalam mengembangkan laser untuk CLSM sehingga menjadi teknik standar menjelang akhir tahun 1980-an. Pada tahun 1978, Thomas dan Christoph Cremer merancang proses pemindaian laser, yang memindai permukaan tiga dimensi obyek dengan titik-titik dengan menggunakan sinar laser yang terfokus, dan menciptakan semua gambar dengan cara elektronik yang serupa dengan yang digunakan pada mikroskop pemindaian elektron. Desain CSLM ini untuk pertama kalinya menggabungkan metode pemindaian laser dengan deteksi 3 dimensi pada objek biologi berlabel dengan penanda yang berpendar. Selama dekade berikutnya, mikroskop fluoresensi confocal dikembangkan menjadi teknologi yang benar-benar matang, terutama oleh kelompok-kelompok yang bekerja di University of Amsterdam dan Laboratorium Biologi Molekuler Eropa (EMBL) di Heidelberg dan mitra industrinya (Anonymous, 2009e).

Menurut Tortora (2001), prinsip kerja dari mikroskop ini mirip seperti pada mikroskop *fluoresensi*. Pertama, spesimen diwarnai dengan *fluorochrome* supaya memantulkan cahaya. Mikroskop ini menggunakan penerangan berupa sinar laser dan dapat dihubungkan dengan komputer sehingga mampu menghasilkan gambar tiga dimensi.

Dengan teknologi laser, pemindaian menjadi lebih akurat dan bisa dilakukan pada obyek dalam keadaan utuh, tanpa melalui teknik preparasi. Pemindaian dengan teknik preparasi selama ini, dirasa kurang optimal. Kelebihan lain, alat ini bisa dioperasikan untuk sel atau organisme hidup dan berfluoresensi, dengan keluaran berupa foto, grafik, dan data secara *realtime* dan per sel (Farid, 2007). Dalam pemindaian laser confocal mikroskop, sinar laser melewati sebuah

lubang sumber cahaya dan kemudian difokuskan oleh lensa objektif menjadi kecil (idealnya difraksi terbatas) dalam volume fokus atau pada permukaan spesimen. Khususnya aplikasi di bidang biologi, spesimen yang mungkin berpendar. Cahaya laser akan tersebar dan dicerminkan atau dipantulkan seperti halnya banyak pendaran cahaya dari bintang sinar kemudian dikumpulkan kembali oleh lensa obektif. Sebuah *beam splitter* memisahkan beberapa bagian dari cahaya ke dalam deteksi alat, yang mana mikroskop fluoresensi konfokal juga akan mempunyai filter yang secara selektif melewati pendaran panjang gelombang sewaktu memblokir eksitasi panjang gelombang asli. Setelah melewati *pinhole*, intensitas cahaya dideteksi oleh alat atau perangkat photodeteksi (biasanya tabung *photomultiplier* (PMT)), mengubah sinyal cahaya menjadi listrik yang kemudian dicatat oleh komputer (Anonymous, 2009e).



Gambar 2.9 Prinsip kerja mikroskop konfokal

http://sbio.uct.ac.za/Webemu/training/EM_for_biologists/clsm/

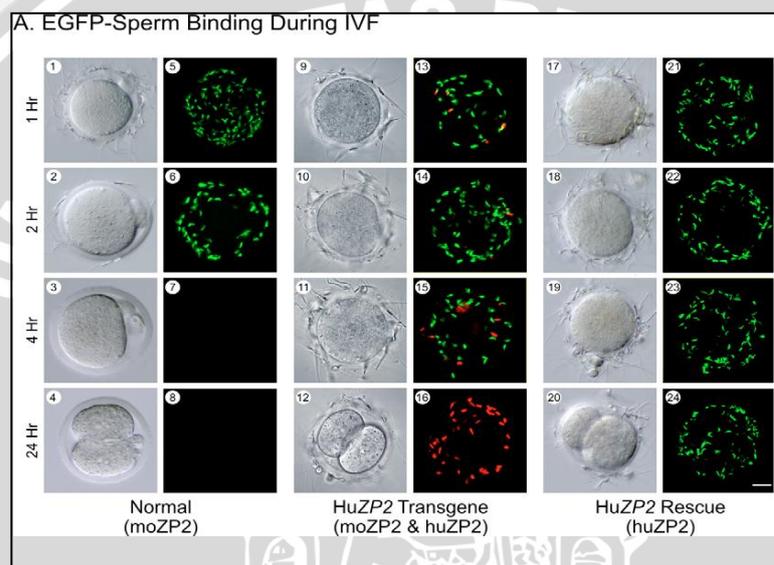
Aperture detektor menghalangi cahaya yang tidak berasal dari titik fokus, seperti yang ditunjukkan oleh garis abu-abu titik-titik pada gambar. *The out of focus* cahaya ditekan, artinya sebagian besar cahaya kembali diblokir oleh *pinhole*

(lubang jarum) yang mana menghasilkan gambar lebih tajam daripada teknik mikroskopi fluoresensi biasa dan membantu untuk mendapatkan gambar dari bidang sampel dengan kedalaman yang berbeda. Cahaya yang terdeteksi berasal dari elemen volume yang bersinar dalam spesimen yang merupakan salah satu pixel dalam gambar yang dihasilkan. Seperti laser scan diatas bidang gambar, keseluruhan bidang gambar diperoleh secara tahap demi tahap dan baris demi baris, sedangkan kecerahan piksel gambar yang dihasilkan sesuai dengan intensitas relatif cahaya yang terdeteksi. Cahaya yang di scan melewati sampel dibidang horizontal dengan menggunakan satu atau lebih cermin bolak balik. Kecepatan scan dapat bervariasi. Scan lambat memberikan sinyal yang lebih baik dan resolusi yang lebih tinggi. Informasi dapat dikumpulkan dari berbagai bidang fokus yang menaikkan atau menurunkan tahapan mikroskop atau lensa objektif. Komputer dapat menghasilkan gambar 3 dimensi dari spesimen dengan mengumpulkan banyak gambar 2 dimensi dari *focal plane* secara berturut-turut (Anonymous, 2009e).

Laser digunakan untuk memberikan eksitasi cahaya (untuk mendapatkan intensitas cahaya tertinggi). Sinar laser (biru) dipantulkan sebuah cermin *dichroic*. Dari sana, laser mengenai 2 cermin yang dipasang di motor (penggerak). Laser cermin scan melewati sampel. Pewarna di sampel fluoresence dan cahaya yang dipancarkan (hijau) dapat discan oleh cermin yang sama yang digunakan untuk memindai eksitasi cahaya (biru) dari laser. Cahaya dipancarkan melewati *dichroic* dan difokuskan ke *pinhole*. Cahaya yang melewati *pinhole* diukur oleh detektor yaitu sebuah tabung photomultiplier (Anonymous, 2007).

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) secara luas digunakan dalam berbagai disiplin ilmu biologi, biologi sel, genetika, mikrobiologi dan biologi pembangunan (Anonymous, 2009e).

Gambar dari *Confocal laser scanning* diperoleh dari Zeiss LSM 510 *confocal microscope* (Rankin *et al.*, 2003). Untuk mendeteksi reaksi akrosom sperma, sampel diinkubasi selama 15 menit sebelum difiksasi dengan soybean trypsin inhibitor (SBTI) dan terkonjugasi dengan Alexa 568 (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA) menurut aturan protokol. Sampel difiksasi dengan 2% *paraformaldehyde* dan diwarnai dengan *Hoechst 33342* sebelum pencitraan (Baibakov *et.al* , 2007). Seperti yang ditunjukkan pada gambar dibawah ini :



Gambar 2.10 Sel sperma mengikat huZP2 pada embrio tikus setelah fertilisasi (Baibakov, 2007)

Penggunaan CLSM juga bisa digunakan untuk mengukur perubahan pH di akar *Lupinus angusti folius L* sebagai jawaban dari pH yang tinggi (Yu, 2001).

2.8 Propidium Iodide (PI)

Beberapa bahan pewarna yang digunakan untuk mewarnai DNA dalam cell, diantaranya yaitu : Propidium Iodide, Ethium Bromide, Acridine Orange, Mithramycin, DAPI, Chromomycin. Biasanya yang lebih sering digunakan sebagai pewarna DNA dalam analisis sel yaitu *Propidium Iodide* (PI). Ketika PI dilekatkan pada DNA, menghasilkan pendaran warna merah yang kuat

(pancaran maksimum 637 nm). Pendarannya mempunyai gelombang cahaya 488 nm, dimana dalam jarak yang sebagian besarnya arus cytometer. Dalam pewarnaan dengan PI, pertama-tama sel harus difiksasi terlebih dahulu (Wink, 2002).

Menurut Anonymous (2009f) Propidium Iodide (PI) adalah molekul yang berpendar dengan memiliki molekul yang banyak yaitu 668.4 Da yang dapat digunakan untuk mewarnai DNA. PI dapat digunakan untuk membedakan *necrotic*, *apoptotic* dan sel normal. PI memiliki batas tertentu untuk asam nukleat, pendarannya ditinggikan 20 sampai 30 kali, eksitasi pendaran maksimum untuk warna merah yaitu 30-40 nm dan pancaran pendaran maksimum untuk warna biru adalah 15 nm. PI sangat cocok untuk *fluorescence microscopy*, *confocal laser scanning microscopy*, *flow cytometry* dan *fluorometry*. PI adalah membran *impermeant* dan biasanya dikeluarkan dari sel hidup. PI umumnya digunakan untuk mengidentifikasi sel mati dalam populasi. Latar belakang warna merah yang berpendar, digunakan untuk menentukan sub-lokasi dari penyatuan ekspresi gen dengan *Green Fluorescent Protein* (GFP). Propidium Iodide juga bisa digunakan untuk mewarnai sel hewan. Contohnya, pada *Apodemus sylvaticus* atau biasanya yang lebih dikenal sebagai tikus hutan, dapat digunakan untuk mengindikasi lokasi daerah atau wilayah atom yang memancarkan karakteristik warna merah yang berpendar.

Propidium iodide (PI) mengikat untai ganda DNA dan RNA setelah sel mengalami permeabilisasi. Begitu terikat pada asam nukleat, inti berwarna merah seperti yang diamati dengan mikroskop fluorescent dengan filter rhodamine. PI berguna untuk pewarnaan analisis multi warna fluorescent. Warna merah pada inti sangat baik untuk digunakan bersamaan dengan FITC, PE atau Cy5. Untuk analisis aliran cytometry, pewarnaan PI dapat dipantau dalam saluran FL2. PI

juga dapat digunakan untuk mengukur viabilitas sel karena pewarna ini dikeluarkan dari sel-sel sehat (Anonymous, 2010g).

Propidium Iodide (PI) mempunyai formulasi kimia $C_{27}H_{34}N_4I_2$, dengan nomor CAS / nama : 25535-16-4 / Phenanthridinium, 3,3',6,6'-diamino-5,5'-[(diethylmethylammonio) propil]-6-fenil-, diiodide (Anonymous, 2009h).

Garner dan Lawrence (1995), menemukan bahwa kombinasi bahan pewarna DNA yaitu SYBR14 dan Propidium Iodide (PI) dapat digunakan untuk memperkirakan perbandingan sperma hidup dan mati pada sampel perlakuan sperma segar dan yang diawetkan. Sperma non motil dan sperma yang terlihat mati berpendar ketika diwarnai dengan SYBR14 saja, tapi intensitas pewarnaannya lebih sedikit daripada sperma hidup yang motil. Dengan penambahan PI, nucleus sperma mati terwarnai dengan warna merah. Beberapa sperma yang hampir mati, terwarnai dengan warna keduanya (hijau dan merah). 3 populasi utama dari penelitian Garner dan Lawrence ini adalah sperma hidup yang terwarnai dengan SYBR14, sperma mati yang terwarnai dengan PI dan sperma yang hampir mati berpendar (memancarkan) warna keduanya (hijau dan merah).

2.9 Ekspresi Gen

Ekspresi gen adalah proses penentuan sifat dari suatu organisme oleh gen. Suatu sifat yang dimiliki oleh suatu organisme merupakan hasil proses metabolisme yang terjadi di dalam sel. Proses metabolisme dapat berlangsung karena adanya enzim yang berfungsi sebagai katalisator proses-proses biokimia. Enzim dan protein lainnya diterjemahkan dari urutan nukleotida yang ada pada molekul mRNA, dan mRNA itu sendiri disintesis berdasarkan utas cetakan DNA. Gen tersusun dari molekul DNA sehingga gen menentukan sifat suatu organisme (Suharsono, 2010). Sedangkan menurut Jusuf (2010), proses ekspresi gen

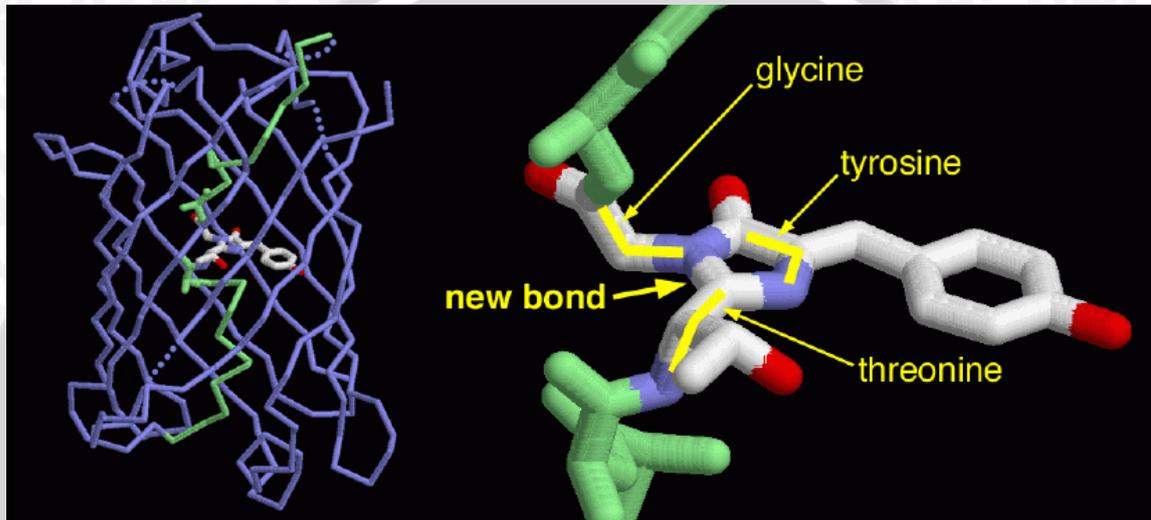
adalah proses transformasi informasi melalui transkripsi dan translasi untuk pembentukan protein atau enzim. Karena protein dan enzim sangat berperan dalam menjalankan metabolisme, maka ekspresi gen sebenarnya merupakan proses pengendalian metabolisme oleh gen. Enzim merupakan katalisator yang berperan menjalankan proses reaksi metabolisme, keberadaan enzim akan menentukan berjalannya proses metabolisme.

Bahan genetik mempunyai beberapa sifat, yaitu dapat menggandakan diri (replikasi), sebagai penyimpanan informasi, dapat mengekspresikan informasi yang dikandungnya dan dapat bervariasi melalui mutasi (Suharsono, 2010).

Awal dari proses ekspresi adalah transkripsi dari informasi genetik yang disimpan di dalam molekul DNA. Transkripsi merupakan proses pembentukan molekul RNA dengan menggunakan DNA sebagai cetaknya. Tidak semua bagian DNA akan ditranskripsikan, tetapi hanya bagian tertentu saja. Bagian tertentu tersebut disebut gen. keseluruhan DNA baik gen maupun sekuensi DNA bukan penyandi (non-coding) yang dikandung oleh suatu organisme disebut dengan genom. Proses transkripsi menghasilkan 3 jenis molekul RNA (asam ribonukleat): RNA duta (mRNA), RNA transfer (tRNA) dan RNA ribosomal (rRNA). Hanya molekul mRNA yang diterjemahkan (ditranslasikan) ke dalam protein. Proses ekspresi selanjutnya adalah translasi, dalam proses translasi, asam amino akan dirangkakan dengan asam amino lainnya untuk membentuk rantai polipeptida atau protein. Jenis asam amino yang dirangkakan ditentukan oleh urutan nukleotida yang terdapat pada molekul mRNA. Jadi, mRNA digunakan sebagai model cetakan bagi sintesis protein. Asam amino dirangkakan dengan asam amino lain dengan ikatan peptida yang dilakukan oleh ribosom. Translasi atau sintesis protein melibatkan banyak molekul, energi dan ribosom. Ribosom dibentuk oleh beberapa jenis molekul rRNA dan beberapa protein ribosomal. Jadi, rRNA berperan dalam penyusunan ribosom. tRNA berperan membawa

asam amino yang sesuai dengan informasi yang ada di dalam molekul mRNA di dalam proses translasi (Suharsono, 2010).

Pada organisme eukaryot, misalnya tumbuhan dan hewan, proses transkripsi terjadi di dalam inti sel, sedangkan proses translasi berlangsung di sitoplasma sehingga RNA harus dikeluarkan dari inti sel ke sitoplasma (Suharsono, 2010).



Gambar 2.11 Struktur *Green Flourescent Protein*
conncol.edu/ccaacd/zimmer/gfp-ww/tsien.html

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain: 1 set alat *Gene Pulser Xcell*TM merk BIO-RAD yang terdiri atas mesin elektroporator, shock pod dan cuvet, mikroskop konvokal (Convocal Laser Scanning Microscope/CLSM) merk Olympus *flouview* versi 1.7a, mikroskop Olympus BX 51 tipe Inverted, mikroskop biokuler merk Olympus CX21, timbangan, penggaris, cawan petri, mangkuk plastik, spuit 5 ml, sectio set, akuarium, bak pemeliharaan induk, wadah, bak plastik, seser, serbet, pisau, handuk, botol film, nampan, mikropipet, appendorf, pipet tetes, Blue tip, yellow tip, kamera digital, obyek glass, cover glass, pH meter, DO meter, Termometer, *handtally counter*, *haemocytometer*, aerator, dan instalasi aerator.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi: induk ikan nilam (*Osteochilus hasselti*), ovaprim larutan fisiologis, HSN-hrGFP, eosin negrosin, tissue, kapas, alkohol 70%, PI(*propidium iodine*), gliserin, cat kuku, larutan PBS, Aluminium Foil, aquadest.

3.2 Metode Penelitian

Menurut Hasan (2002), penelitian adalah penyaluran rasa ingin tahu manusia terhadap sesuatu atau masalah dengan perlakuan tertentu (seperti memeriksa, mengusut menelaah, dan mempelajari secara cermat, dan sungguh-sungguh) sehingga diperoleh sesuatu (seperti mencapai kebenaran, memperoleh jawaban,

pengembangan ilmu pengetahuan, dan sebagainya). Metode yang digunakan ini adalah metode eksperimen. Menurut Hasan (2002) metode eksperimental merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasikan variabel dan meneliti akibatnya. Sedangkan menurut Faisal (1989) penelitian eksperimen adalah penelitian yang secara sengaja memanipulasi suatu variabel (memunculkan atau tidak memunculkan suatu variabel) kemudian memeriksa efek atau akibat yang ditimbulkannya.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Rancangan Acak Kelompok adalah suatu rancangan dasar yang menggunakan pengawasan setempat dengan pembatasan pengacakan atau merupakan suatu rancangan dimana suatu lingkungan percobaan dikelompokkan sedemikian rupa, sehingga terdapat homogenitas maksimum dalam setiap kelompok dan minimum antar kelompok (Yitnosumarno, 1993) .

Model umum untuk metode RAK yaitu :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Dimana : Y_{ij} = nilai pengamatan pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

μ = nilai rata-rata (tengah umum)

α_j = pengaruh perlakuan level ke- i (faktor perlakuan pertama)

β_j = pengaruh perlakuan level ke- j (faktor perlakuan lainnya)

ϵ_{ij} = gallat / kesalahan percobaan / acak percobaan

Pada penelitian ini dilakukan 2 uji faktor, antara lain :

Faktor I = lama kejutan (*Pulse length*) dengan 2 level, yaitu :

- A1 = 0,5 ms
- A2 = 1 ms

Faktor II = jumlah kejutan (*Pulse number*) dengan 3 level, yaitu :

- B1 = 2x kejutan
- B2 = 4x kejutan
- B3 = 6x kejutan

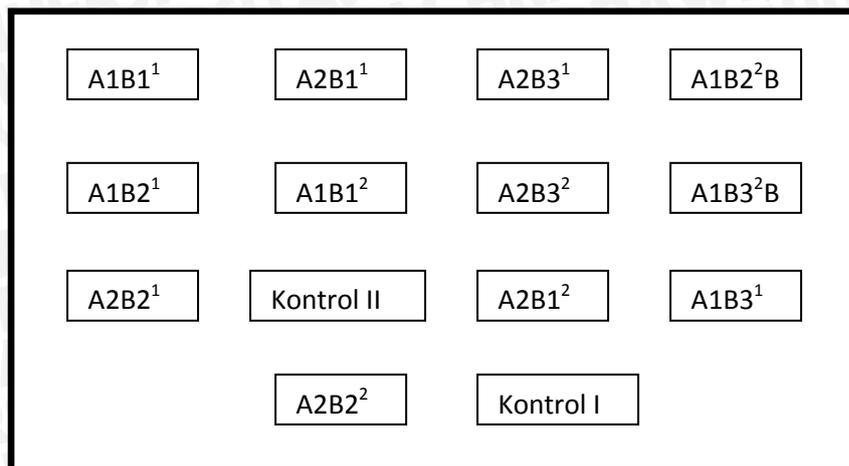
Sehingga dilakukan dua kali tahap percobaan, yang pertama adalah pengujian *Pulse length* 0,5 ms dengan 3 level kejutan dan kedua pengujian *Pulse length* 1 ms dengan 3 level kejutan. Penelitian ini digunakan kuat medan listrik 40 V/cm dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L, sehingga masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut :

A1B1	→	Pulse Length 0,5 ms + pulse number 2x
A1B2	→	Pulse Length 0,5 ms + pulse number 4x
A1B3	→	Pulse Length 0,5 ms + pulse number 6x
A2B1	→	Pulse Length 1 ms + pulse number 2x
A2B2	→	Pulse Length 1 ms + pulse number 4x
A2B3	→	Pulse Length 1 ms + pulse number 6x

Pada penelitian ini juga dilakukan dua kali kontrol (tanpa perlakuan), yaitu :

- K1 = sperma sebelum perlakuan
- K2 = sperma sesudah perlakuan

Pada percobaan ini dilakukan ulangan sebanyak 2 kali, sehingga dibutuhkan $2 \times 3 \times 2 = 12$ unit percobaan. Selanjutnya perlakuan kombinasi diacak pada 12 unit percobaan tersebut. Model dari denah penelitian ini ditunjukkan oleh Gambar 3.12 pada halaman berikutnya.



Gambar 3.12 Denah penelitian

3.4 Analisis Data

Data hasil penelitian di analisa dengan menggunakan program SPSS 16. Data dari hasil penelitian yang diperoleh, dapat bersifat tidak normal akibat adanya variasi yang timbul akibat perlakuan. Karena itu data diuji kenormalannya dengan uji Kolmogorof-Smirnov (Dude dan Satya, 1995). Selanjutnya di uji melalui *analysis of variance* (UNIANOVA). Dari hasil tersebut akan diperoleh nilai *sig.* dan selanjutnya dibandingkan dengan α , apabila nilai *sig.* lebih kecil dari α maka diterima H1 atau ditolak Ho, begitu pula sebaliknya (Hanafiah, 1993).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

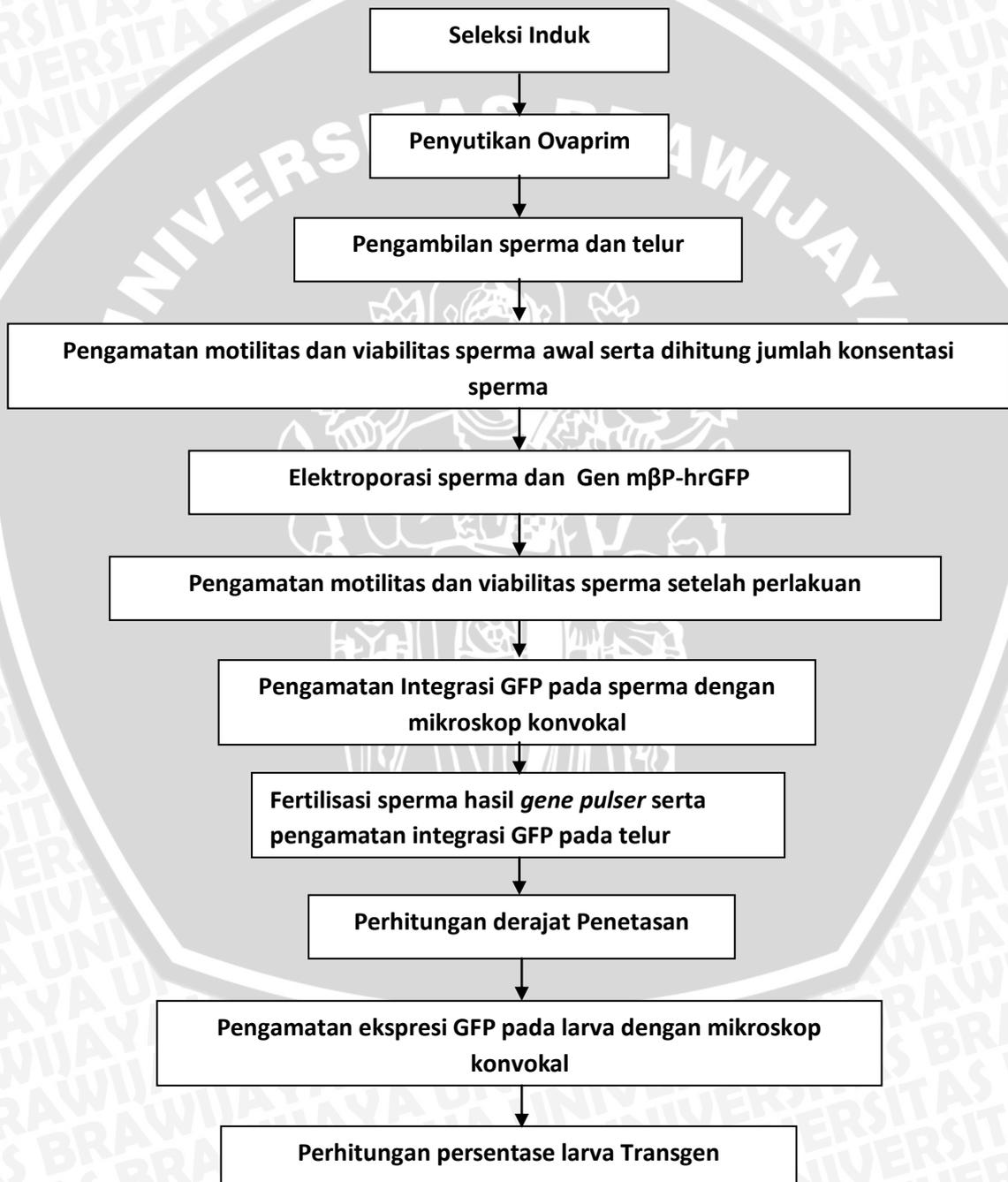
Persiapan Penelitian ini meliputi :

- Dilakukan pemilihan ikan uji seminggu sebelum perlakuan dan dipelihara serta diberi pakan secara rutin.
- Dilakukan pengamatan mengenai morfologi, motilitas dan viabilitas sperma serta penghitungan konsentrasi sperma.

- Persiapan wadah sebagai tempat untuk telur yang telah difertilisasi dengan sperma yang telah di elektroporasi, wadah yang disiapkan telah dibersihkan dan diisi air serta dipasang instalasi aerasi.

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

- **Diagram Alir Kegiatan Penelitian**



- **Seleksi Induk**

Induk ikan nilam baik jantan maupun betina sebelum diambil sperma dan telurnya, terlebih dahulu diseleksi untuk mendapatkan induk yang berkualitas. Karena secara visual, antara induk jantan maupun betina mempunyai ciri fisik yang sama, maka cara yang sederhana adalah dengan memilih induk yang sehat (tidak terdapat luka), selanjutnya untuk induk jantan perutnya mengembang dan terasa empuk ketika diraba. Berumur 8 bulan Berat badan sekitar 100 g. Bila dipijat (*stripping*) perut ke arah alat genital, induk jantan akan mengeluarkan cairan seperti susu. Sedangkan untuk induk betina, pada umumnya usia 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.

- **Penyuntikan ovaprim**

Ovaprim adalah merek dagang bagi hormon analog yang mengandung 20 µg analog salmon gonadotropin releasing hormone (s GnRH) LHRH dan 10 µg domperidone sejenis anti dopamin, per milimeter (Mukhlas, 2009). Ovaprim digunakan sebagai agen perangsang bagi ikan untuk memijah, kandungan sGnRH akan menstimulus pituitari untuk mensekresikan GtH I dan GtH II. Sedangkan anti dopamin menghambat hipotalamus dalam mensekresikan dopamin yang memerintakan pituitari menghentikan sekresi GtH I dan GtH II. Fungsi penyuntikan ovaprim antara lain: merangsang produksi sperma pada jantan dalam volume yang lebih banyak dan merangsang pematangan gonad sebelum musim pemijahan (Mukhlas, 2009).

Sebelum disuntik ovaprim, induk jantan maupun betin ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan jumlah ovaprim yang diberikan. Dosis ovaprim yang

digunakan untuk induk betina adalah 0,3 ml/kg. Dosis ini dibawah petunjuk label adalah 0,5 ml/kg, hal ini karena pada dosis 0,3 ml/kg sudah cukup untuk meningkatkan kematangan gonad ikan nilam selain itu juga untuk menghemat bahan. Pada induk jantan penyuntikan ovaprim dilakukan dengan dosis setengah dari dosis yang diberikan pada induk betina. Selain itu berdasarkan penelitian Assubaki (2002), dosis 0,3 mempunyai latensi pemijahan yang tercepat sampai terlama adalah sebagai berikut : dosis 0,3 ml/kg/bw (507 menit atau 8,27 jam), di ikuti dengan dosis 0,4 ml/kg/bw (573 menit atau 9,33 jam), 0,2 ml/kg/bw (576 menit atau 9,36 jam), dosis 0,5 ml/kg/bw (607 menit atau 10,17 jam), dan dosis 0,1 ml/kg/bw (691 menit atau 11,31 jam).

Penyuntikan ovaprim dilakukan pada bagian intramuskular dengan memasukkan jarum injeksi dimasukkan kedalam daging, kemudian jarum ditarik sedikit barulah ovaprim disuntikkan pada sisi kanan dan kiri tubuh ikan nilam. Teknik penyuntikan hormon pada ikan ada 3 yaitu intra muscular (penyuntikan kedalam otot), intra peritorial (penyuntikan pada rongga perut), dan intra cranial (penyuntikan di kepala) (Susanto, 1999). Santoso (1997) menambahkan, penyuntikan disarankan mengarah ke bagian depan (arah kepala) ikan, agar tidak mengenai organ bagian pencernaan dan tulang ikan. Apabila mengenai organ tersebut maka proses penyuntikan tidak akan memacu kelenjar hipofisa untuk mengeluarkan hormon GnRH dalam proses pemijahan (tidak terjadinya proses pemijahan).

• Pengambilan Sperma dan Telur

Pengambilan sperma dan telur dilakukan setelah *latency time*. Pengambilan telur dilakukan dengan menstripping induk betina, caranya adalah mengurut bagian perut ikan, dimulai dari bawah *linea lateralis* (diatas sirip perut) ke arah lubang genital. Selanjutnya telur ditaruh dalam mangkuk dan ditutup serbet

setengah basah untuk menghindari telur kering akibat sinar matahari. Telur-telur tersebut kemudian diambil 0,25 gr dan dietakkan dalam cawan petri dengan tetap ditutup serbet. Sedangkan untuk induk jantan, pelakuan juga sama, yaitu dengan cara distripping bagian perut ikan sampai keluar cairan yang berwarna putih seperti susu. Kemudian disedot dengan menggunakan spuit yang telah dicampur dengan NaFis dengan perbandingan 1:1.

- **Pengamatan Motilitas dan Viabilitas Sperma Sebelum dan Sesudah Perlakuan**

Motilitas sperma yaitu pergerakan spermatozoa, sedangkan viabilitas yaitu kemampuan hidup dari spermatozoa. Cara pengamatan motilitas dan viabilitas sperma sebelum dan sesudah perlakuan sama. Pengamatan motilitas sperma dilakukan dengan mengambil sejumlah sperma lalu ditetaskan pada obyek glass kemudian ditetesi dengan aquades. Setelah itu diamati pergerakan sperma dan ditentukan motilitas massal dan individu.

- Motilitas massal, ditentukan berdasarkan jenis pergerakannya (*fast progressive, non-progressive, atau immotile*).
- Motilitas individu, ditentukan berdasarkan jumlah sperma yang bergerak dan yang tidak (dalam %).

Pengamatan viabilitas sperma bertujuan untuk mengetahui jumlah sperma yang hidup dan yang mati. Caranya adalah dengan menetaskan sejumlah sperma dalam obyek glass kemudian diberikan pewarna eosin negrosin dan di smear dengan cover glass. Menurut Toelihere (1985) pewarnaan semen digunakan untuk membedakan sperma yang hidup dan yang mati. Zat warna yang umum dipakai adalah eosin atau merah kongo terhadap latar belakang hitam dari negrosin.

Setelah pewarnaan eosin pada obyek glass kering, selanjutnya ditentukan persentase viabilitas sperma dengan menghitung jumlah sperma yang hidup (berwarna bening) dan sperma yang mati (berwarna kemerahan) menggunakan *handtally counter* secara bersamaan. Nilai persentase viabilitas sperma dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Viabilitas sperma} = \frac{\sum \text{spermahidup}}{\sum \text{total sperma}} \times 100\%$$

❖ Elektroporasi Sperma

Tahapan Elektroporasi sperma yaitu :

- Disambungkan steker alat kesumber listrik.
- Ditekan tombol "POWER (0 -)" disamping kanan alat untuk menyalakan elektroporator maka muncul tampilan awal pada screen "Home screen"
- Pada tampilan Home screen dipilih option No.4 "User Protocols" dengan cara menekan tombol "4" pada keypad atau mengarahkan cursor ke nomor 4.
- Diberikan nama dan entry data jumlah tegangan yang diperlukan sesuai dengan perlakuan (40 volt) dan ukuran cuvet yang digunakan (0,2 cm). Setelah itu di save.
- Dimasukkan sperma sejumlah (25 l) DAN hHSC-hrGFP (2 L) dengan konsentrasi sesuai perlakuan kedalam cuvet.
- Ditutup cuvet dan dikeringkan dengan tissue.
- Dimasukkan cuvet dalam shock Pod.
- Tekan tombol "PULSE" untuk menjalankan gene pulser.
- Muncul hasil dengan tampil sesuai dengan parameter yang dipilih.

- Untuk menjaga agar sperma tidak aktif dan dapat bertahan lama maka ditambahkan pengencer (Nafis) sebanyak 273 L dan dicampurkan didalam cuvet.
- Diambil cairan dalam cuvet seluruhnya dsengan menggunakan spuit kemudian dipindahkan dalam appendorf.
- Diambil 150 L untuk difertilisasi dengan telur, 5L untuk diamati motilitas sperma, dan 5 L untuk diwarnai dengan eosin negrosin untuk mengetahui viabiliats sperma. Sisanya digunakan untuk pengamatan integrasi gen GFP dengan menggunakan mikroskop konvokal.

• **Pengamatan integrasi mβP-hrGFP pada sperma dengan mikroskop konvokal**

Setelah sperma dielektroporasi sebagian sperma diamati dalam mikroskop konvokal, sedangkan sisanya untuk difertilisasi pada telur. Sperma yang akan diamati diletakkan pada obyek glass dan kemudain diamati ekspresinya dibawah mikroskop konvokal. Sperma yang terintegras GFP akan berpendar hijau. Setelah itu dihitung jumlah sperma yang berpendar dibawah mikroskop konvokal pada satu bidang pandang menggunakan *handtally counter* dan ditentukan persentase sperma membawa transgen (PSMT) dengan rumus :

$$PSMT = \frac{\sum \text{Sperma Terintegrasi GFP sampai ke inti}}{\sum \text{telur total}} \times 100\%$$

Selain perhitungan persentase sperma yang terbawa transgen, diamati pula letak integasi gen GFP serta sebaran dan intensitasnya.

• **Fertilisasi telur dan sperma hasil transgen**

Sperma hasil elektroporasi kemudian difertilisasikan dengan telur. Fertilisasi dilakukan dengan mencampurkan sperma transgen dengan 0,25 gr telur dengan jumlah \pm 174 butir. Jumlah ini dirasa ideal untuk mewakili dan memudahkan pengamatan. Setelah telur dan sperma dicampurkan kemudian diberikan

aquades (untuk mengaktifkan sperma) dan diaduk perlahan. Setelah dihitung derajat fertilisasi dengan rumus :

$$\text{Derajat Fertilisasi (DF)} = \frac{\sum \text{telur terbuahi}}{\sum \text{telur total}} \times 100\%$$

- **Pengamatan ekspresi mβP-hrGFP pada larva**

Telur hasil fertilisasi diamati dibawah mikroskop konvokal. Tujuannya untuk mengetahui apakah telur hasil fertilisasi tersebut tersisipi GFP atau tidak. Caranya dengan mengambil 5-10 butir telur yang terbuahi secara acak sebagai sampel dan kemudian diamati di mikroskop konvokal. Kemudian diamati letak pendarannya dan dibandingkan dengan telur kontrol,. Selanjutnya dihitung persentase embrio pembawa transgen dengan rumus:

$$\text{Persentase embrio pembawa transgen (PEMT)} = \frac{\sum \text{embrio transgen}}{\sum \text{embrio sampel}} \times 100\%$$

- **Pengamatan ekspresi mβP-hrGFP pada larva**

Setelah menetas, ekspresi gen pada larva juga perlu diamati. Dengan melakukan pengamatan ekspresi gen pada larva maka dapat diketahui apakah gen GFP masih terekspresi pada larva atau tidak. Pengamatan larva transgen dilakukan dengan menggunakan mikroskop konvokal serta diamati pula letak integritasnya pada larva. Kemudian dihitung persentase larva pembawa transgen dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persentase larva pembawa transgen (PLMT)} = \frac{\sum \text{Larva transgen}}{\sum \text{embrio sampel}} \times 100\%$$

3.6 Parameter Penelitian

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini antara lain :

- Teridentifikasi atau tidaknya GFP pada sperma setelah dielektropoasi pada mikroskop konvokal.

- Teridentifikasi atau tidaknya GFP pada embrio dan larva hasil fertilisasi dengan sperma yang telah di elektroporasi.

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini yaitu :

- Perubahan nilai motilitas dan viabilitas sperma
- Derajat fertilisasi (DF) = $\frac{\sum \text{telur terbuahi}}{\sum \text{telur total}} \times 100\%$
- Derajat Penetasan (DP) = $\frac{\sum \text{telur menetas}}{\sum \text{telur terbuahi}} \times 100\%$



4. HASIL DAH PEMBAHASAN

4.1 Motilitas Sperma Kontrol Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

Motilitas sperma kontrol digunakan sebagai acuan dalam perbandingan bagi sperma perlakuan. Semakin tinggi motilitas sperma kontrol, maka untuk perlakuan selanjutnya semakin baik. Menurut Adewumi *et al.* (2005), kualitas sperma bervariasi tergantung pada berbagai faktor eksternal seperti pemberian pakan dan mutu makanan. Ciri-ciri fisik sperma yaitu berwarna putih susu dan kental.

Dari hasil analisa persentase kualitas sperma ikan nilem yang digunakan terlihat cukup baik, pada kontrol sebelum perlakuan sebesar 97% sedangkan pada kontrol setelah perlakuan sebesar 76%. Menurut Paisal (2008), motilitas sperma kurang dari 40% kurang baik dalam proses pembuahan telur yang menyebabkan pembuahan tidak berhasil. Ditambahkan Cosson (2008), kecepatan sperma, persentase motilitas merupakan parameter utama. Kualitas sperma yang digunakan dalam perlakuan cukup baik.

Sperma ikan nilem dari tingkat persentase motilitas tersebut diatas hanya bisa bertahan beberapa menit setelah di *striping*. Effendy (1997) menyatakan bahwa kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis hanya berkisar antara 1-2 menit. Menurut Suquest (1994), di alam durasi motilitas sperma terjadi dalam periode yang sangat pendek pada ikan air tawar. Billard (1990) menambahkan bahwa motilitas spermatozoa ikan dibatasi pada periode detik dan menit karena adanya *osmotic injury*. Dalam menjaga daya tahan sperma agar bisa digunakan dalam jangka waktu yang lama, maka perlu di tambahkan larutan Fisiologis. Menurut Rustidja (1985), penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit. Larutan NaCl fisiologis sering digunakan

sebagai bahan pengencer semen yang memberikan sifat buffer dan mampu mempertahankan pH semen dalam suhu kamar (Isnaini, 2000).

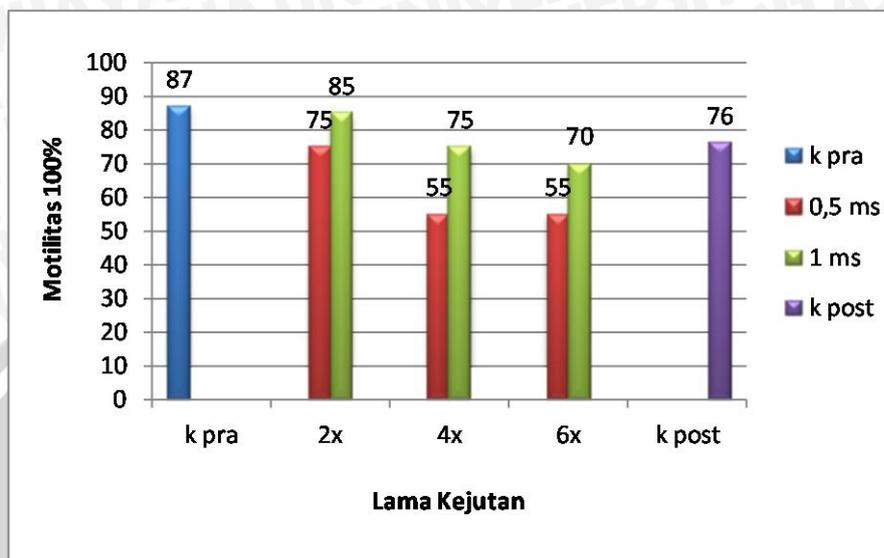
Sperma di ambil sebanyak 0,5 ml per ekor dengan spuit yang dicampur dengan larutan fisiologis, kemudian dimasukkan dalam *appendorf* yang ditempatkan pada wadah yang berisi es, berfungsi untuk menstabilkan kondisi sperma. Menurut Lygler *et al.* (1972), ketahanan hidup sperma dipengaruhi oleh temperatur dan pada umumnya dapat hidup lebih lama pada temperatur rendah. Taurin (1977) menyatakan pertimbangan utama dalam penyimpanan sperma, yaitu terletak pada suhu tempat penyimpanan. Penyimpanan sperma dalam temperatur rendah memegang peranan penting dalam reproduksi sel (Stoss dan Holt, 1983).

Dalam menjaga kestabilan motilitas sperma, efektifitas penggunaan bahan pengencer perlu diperhatikan. Menurut Hafez (2000), fungsi bahan pengencer sebagai 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.

4.2 Motilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) Hasil Elektroporasi

Pengamatan motilitas sperma perlakuan dilakukan untuk memperlihatkan kondisi sperma setelah di elektroforasi dengan jumlah dan lama kejutan yang telah diatur. Pengamatan motilitas sperma perlakuan hasil elektroporasi, menggunakan persentase motilitas sperma dari satu bidang pandang lensa mikroskop. Dari data yang diperoleh, dapat dikatakan bahwa elektroporasi memberi pengaruh terhadap motilitas sperma. Nilai rerata persentase motilitas

yang dihasilkan pada sperma kontrol lebih besar daripada persentase motilitas sperma hasil elektroporasi. Grafik persentase motilitas sperma ikan nilam dapat dilihat pada gambar 4.13 dibawah.



Gambar 4.13 Grafik Motilitas 100%

Dari grafik diatas, terlihat bahwa persentase motilitas tertinggi terdapat pada perlakuan 1 ms 2x dengan persentase sebesar 85%. Sedangkan motilitas terendah terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x dan 0,5 ms 6x dengan persentase 55%. Hasil analisa di atas menunjukkan pengaruh jumlah kejut dan lama kejut mempengaruhi motilitas sperma, karena pada hasil yang diperoleh, persentase motilitas mengalami kenaikan pada kisaran lama kejut antara 0,5 ms hingga 1 ms dengan jumlah kejut yang lebih rendah. Rols dan Justin (1998) mengatakan bahwa durasi kejut listrik yang lebih panjang memiliki efisiensi permeabilisasi yang lebih tinggi serta banyaknya jumlah kejut dapat mengontrol penyerapan makromolekul ke dalam sel sehat, meski dalam durasi (lama) kejut yang singkat.

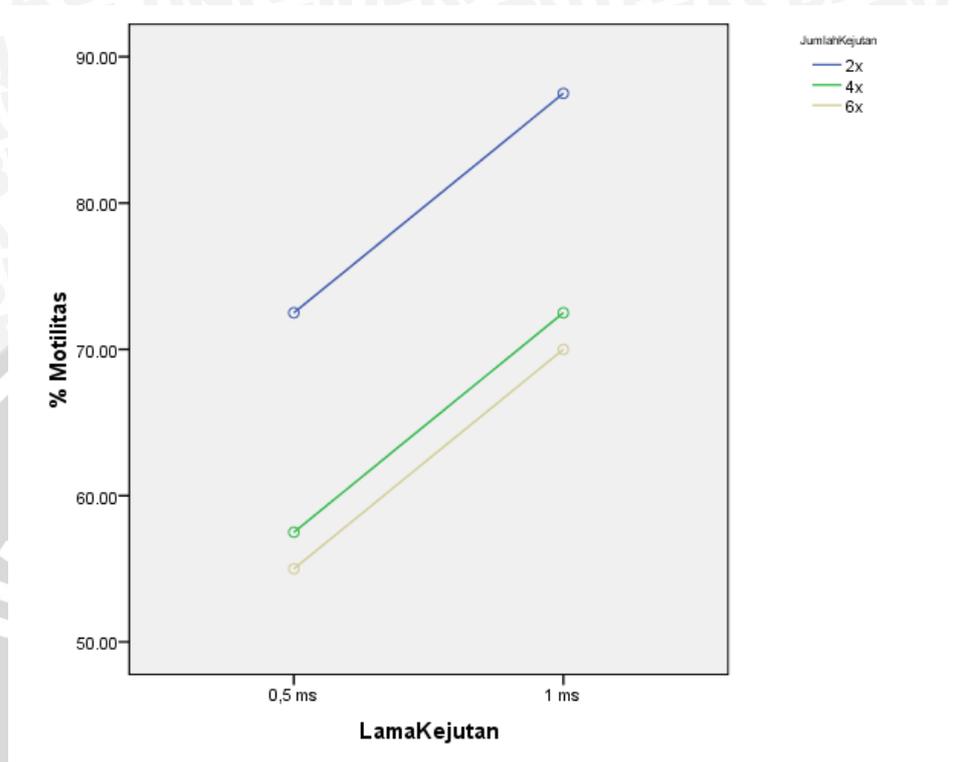
Semakin banyak jumlah kejut, maka motilitas semakin menurun. Penurunan tersebut akibat dari jumlah kejut yang meningkat. Sehingga mengakibatkan kematian yang cukup tinggi. Menurut Anonymous, (2006b), waktu antara masing-

masing kejutan dinamakan interval kejutan (*interval pulse*) yang telah tersetting otomatis jumlah kejutan 1 dan interval kejutan 0, masing-masing dapat disesuaikan dengan memasukkan lama dan frekuensi kejutan sesuai yang dibutuhkan. Elektroporasi dengan perlakuan listrik voltase tinggi menyebabkan permeabilitas tinggi untuk sementara pada membran sel dengan membentuk pori-pori, sehingga DNA mudah penetrasi ke dalam protoplasma. Integritas membran kembali membaik seperti semula dalam beberapa detik sampai semenit setelah perlakuan listrik (Herman, 2009).

Penelitian ini menggunakan tegangan sebesar 40 V/cm, karena pada penelitian soleha (2010), efektifitas penggunaan tegangan dalam elektroporasi sperma ikan nilem sebesar 40 V/cm. Namun, jika tegangan yang digunakan cukup tinggi, maka akan menyebabkan panas pada sel sehingga sel rusak bahkan mengalami kematian. Weaver (1996) mengatakan, apabila tegangan yang diberikan terhadap sperma terlalu besar maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah. Sedangkan Nakamura (2009) menyebutkan, penggunaan tegangan listrik tinggi yang diberikan pada sampel dapat menyebabkan panas yang bisa membunuh sebagian besar sampel yang dielektroporasi. Sin *et al.* (1993), juga mengatakan bahwa pada tegangang rendah persentase motilitas sperma mencapai 60%, sedangkan pada perlakuan tegangan tinggi motilitas hanya mencapai 10%.

Dari hasil sidik ragam (lampiran 2) motilitas sperma ikan nilem hasil elektroporasi, menunjukkan bahwa perlakuan Lama Kejutan (*Pulse Lenght*) memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap motilitas sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) dengan nilai Sig. (0,011) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Sedangkan pemberian lama kejutan (*Pulse Number*) juga memberikan pengaruh berbeda nyata, dengan nilai Sig. (0,029) < α yang b yang

berarti menerima H_1 menolak H_0 . Untuk mengetahui grafik interaksi motilitas dengan Pulse length bisa dilihat pada grafik pada halaman berikut.



Gambar 4.14 Hubungan Antara Lama Kejutan dan Motilitas

Dari grafik hubungan antara lama kejutan dan motilitas diketahui bahwa nilai motilitas semakin meningkat dengan penambahan lama kejutan. Dapat disimpulkan bahwa perlakuan lama kejutan (*Pulse length*) 1 ms memberikan nilai motilitas tertinggi daripada pemberian lama kejutan 0,5 ms. Dari tren umum yang telah diamati menunjukkan bahwa kekuatan lama kejutan yang digunakan untuk transfer gen lebih efisien jika dinaikkan dengan selang lama kejutan antara 0,5 ms hingga 1 ms untuk mendapatkan nilai optimal. Kejutan yang lebih dari satu pada daya kejutan tampaknya lebih efisien dalam transfer gen (Sin, 2008).

Apabila membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa akan kehilangan motilitasnya dan mengakibatkan kematian (Shimogiri, 2009).

Ditambahkan Agarwall *et al.* (2003), bahwa 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. Karena keutuhan membran plasma sangat berkorelasi dengan motilitas spermatozoa (Yu dan Leibo 2002).

Analisa morfologi sperma yang telah dielektroporasi telah dilakukan dengan mikroskop *electron*, menunjukkan bahwa pada umumnya terjadi kecacatan karena terpisahnya ekor dengan *filamen microtubule*. Efisiensi transfer gen tergantung pada kekuatan lamanya dan jumlah kejutan. Meskipun demikian, kondisi saat elektroporasi harus tetap diperhatikan. Elektroporasi dengan menggunakan metode “*square wave*” dapat menghantarkan rangkaian kejutan lebih dari satu pada sel. Karena itu untuk efisiensi yang lebih tinggi dan agar jaringan yang rusak lebih sedikit, penggunaan voltase yang rendah dan jumlah kejutan yang minimum, serta penggunaan “*square wave*” generator disarankan untuk elektroporasi (Shimogori, 2009).

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). Jadi, bisa dikatakan kualitas sperma yang baik menentukan keberhasilan perlakuan elektroporasi.

4.3. Mortalitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochillus hasselti*)

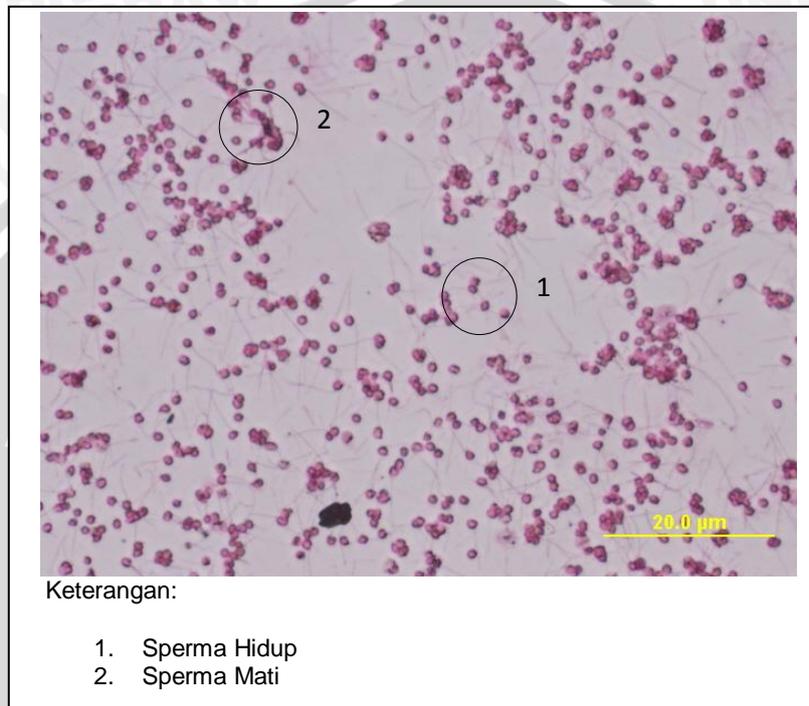
Mortalitas adalah jumlah individu yang mati yang tercatat menurut satuan waktu atau persentase individu yang mati terhadap jumlah total individu (Lumenta, 2000). Pengamatan mortalitas sperma kontrol juga sangat penting dilakukan sebelum elektroporasi, karena akan dibandingkan dengan persentase sperma

hidup yang di elektroporasi. Pada penelitian ini yang dimaksud dengan sperma kontrol yaitu sperma yang tidak diberikan kejutan listrik, pengamatan sperma kontrol dilakukan 2 kali, yaitu sebelum dan sesudah di elektroporasi. Nilai mortalitas sperma kontrol sebelum elektroporasi didapatkan sebesar 47,05% dan nilai mortalitas kontrol sperma setelah elektroporasi didapatkan sebesar 29,41% (lampiran 16). Dari hasil analisa menunjukkan, persentase mortalitas sperma kontrol sebelum perlakuan lebih besar dibandingkan sesudah perlakuan. Hal ini menunjukkan kestabilan kualitas sperma selama penyimpanan pada suhu rendah. Karena sperma mengalami shock effect saat proses striping sebelum di aklimatisasi dengan suhu rendah. Menurut Wira (2007), motilitas sperma sangat bergantung terhadap lingkungan. Seperti; suhu, larutan pengencer serta ketepatan dalam penanganan sperma.

Proses penanganan sperma dengan cara, sperma distriping kemudian dimasukan pada *appendorf* dan ditempatkan pada wadah yang berisi es batu agar kondisi sperma tetap stabil, seperti pernyataan Stoss (1983), bahwa suhu yang rendah dapat menstabilkan kondisi fisika-kimia sperma selama perlakuan. Sedangkan tolihere (1981) menambahkan bahwa kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan bertahan lebih lama dalam suhu yang rendah.

Untuk mengetahui nilai mortalitas pada sperma kontrol perlu dilakukan pewarnaan sel sperma. Pewarnaan pada sel sperma menggunakan pewarna *eosin negrosin*, dimana eosin berfungsi sebagai penanda sel-sel mati, sedangkan negrosin digunakan untuk memberikan warna pada latar belakang. Apabila spermatozoa tersebut mati, maka permeabilitas membran meninggi, terutama didaerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dan spermatozoa yang mati (Tang dan Afandy, 2001). Sedangkan menurut Revay *et al.* (2004) teknik

pewarnaan sel dapat menentukan morfologi dan integritas membran meliputi morfologi, sperma normal, daya tahan hidup dan keutuhan akrosom. Untuk menentukan sperma yang hidup dan mati dapat dilihat pada gambar 4.15 di bawah.



Gambar 4.15 Sperma Ikan Nilem dengan Pewarnaan *Eosin Negrosin*

Seperti yang ditunjukkan pada gambar di atas, sperma hidup ditandai dengan warna transparan, sedangkan sperma yang mati berwarna agak kemerahan (menyerap warna) dan menggumpal. Perhitungan persentase ini bertujuan untuk mengetahui nilai mortalitas sperma. Menurut Suarni (2009), Mortalitas sperma ditentukan dengan cara menghitung jumlah sperma yang hidup dari 100 sperma yang dihitung dan hasilnya dinyatakan dalam persen. Semakin besar jumlah mortalitas sperma, maka kemampuan untuk menembus lubang mikropil juga semakin tinggi (Hidayaturrohmah, 2007).

Dari gambar sperma, diketahui bahwa panjang total sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) $\pm 7,75 \mu\text{m}$ dengan lebar kepala $\pm 2,25 \mu\text{m}$ (Lampiran 15).

Sedangkan menurut Anonymous (2009k) sel sperma mempunyai ukuran panjang keseluruhan 50 – 60 μm , dimana terdiri dari dua bagian yaitu bagian kepala dan ekor. Dimensi kepala dengan panjang 4 - 5 μm , lebar 2,5 - 3,5 μm , dengan rasio antara panjang dan lebar yaitu 1,50 – 1,75 μm .

Hasli perhitungan konsentrasi sperma sebesar $1,7 \times 10^9$ sel/ml (lampiran 14).

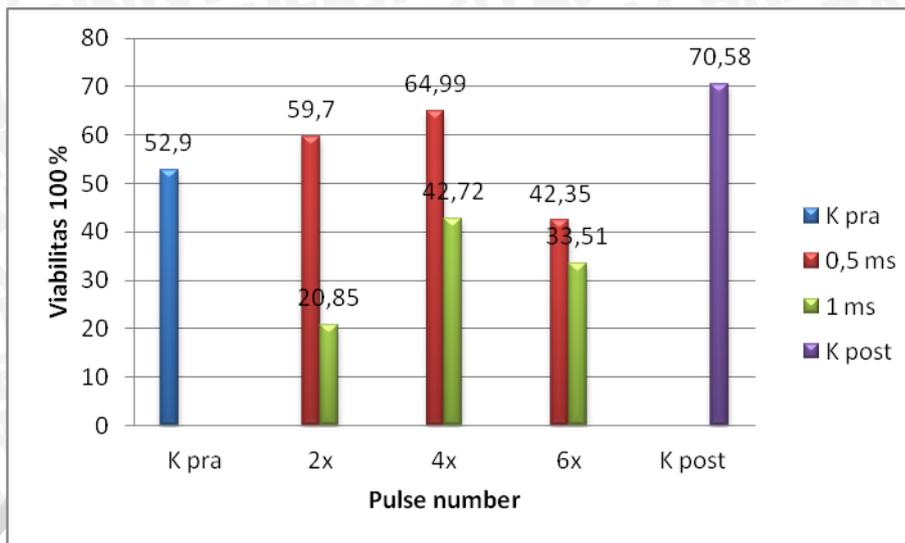
Perhitungan konsentrasi sperma dilakukan dengan mengencerkan sperma murni sebanyak 10 μl dengan menambahkan larutan fisiologis sebanyak 990 μl . Sehingga pengenceran yang digunakan adalah 1000 μl . Karena ukuran sperma yang sangat kecil maka digunakan perhitungan pada kotak terkecil yang memiliki ukuran $1/256 \text{ mm}^3$. Ciri-ciri fisik sperma yaitu berwarna putih susu dan kental. Ginzburg (1972) menyatakan jumlah spermatozoa tiap cc minimum $23,8 \times 10^9$ sel/ml, maksimum $25,6 \times 10^9$ sel/ml dengan rata-rata $24,7 \times 10^9$ sel/ml.

4.4 Viabilitas Sperma Perlakuan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

Hubungan viabilitas sperma dengan mortalitas berbanding terbalik, karena semakin rendah nilai mortalitas maka nilai viabilitas semakin tinggi. Pengamatan viabilitas (daya tahan hidup) sperma dilakukan dengan cara mencatat waktu mulai bergerak lamban, bergerak berputar ditempat (*reservoir*), berdenyut lemah sampai tidak berdenyut lagi atau mati.

Perhitungan viabilitas sperma perlakuan digunakan untuk menentukan nilai persentase kualitas hidup sperma yang digunakan untuk fertilisasi, serta efektifitas integrasi GFP pada embrio sampai larva. Viabilitas tertinggi sperma ikan nilem terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 64,99 %. Sedangkan persentase yang terendah terjadi pada perlakuan 1 ms 2x sebesar 20,85%.

Grafik viabilitas sperma bisa di amati pada gambar di halaman berikut.

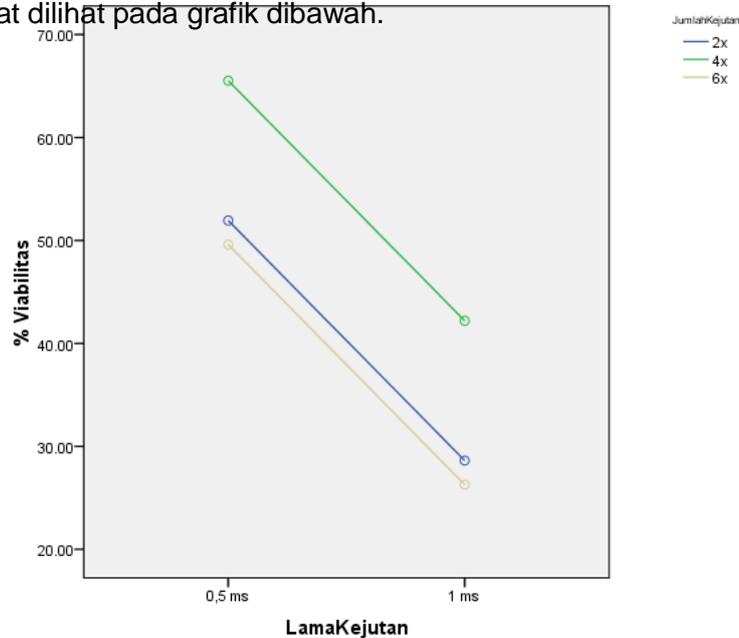


Gambar 4.16 Viabilitas Perlakuan Sperma Ikan Nilot

Pemberian lama kejutan (*Pulse length*) mempengaruhi nilai viabilitas sperma. Jadi, semakin banyak jumlah kejutan, maka nilai viabilitas semakin menurun akibat kerusakan membran. Menurut Weaver (1993), menyatakan bahwa kerusakan membran spermatozoa akan berdampak pada membran yang pada awalnya mempunyai sifat permeabel tidak mampu lagi menyeleksi keluar masuknya zat, yang pada saat dilakukan uji warna eosin negrosin zat tersebut bisa masuk ke dalam plasma. Ditambahkan oleh Yulham (2007), permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Apabila spermatozoa tersebut mati maka permeabilitas membrannya meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dengan spermatozoa yang mati. Untuk mengetahui nilai statistik viabilitas, maka dilakukan analisa sidik ragam yang bisa diamati pada lampiran 3.

Berdasarkan hasil perhitungan analisis sidik ragam diperoleh bahwa perlakuan jumlah kejutan (*Pulse Number*) tidak memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap viabilitas sperma, karena hasil Sig. (0,154) > α . Sedangkan lama

kejutan (*pulse length*) memberikan nilai berbeda sangat nyata dengan nilai Sig. (0,007) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Hubungan antara viabilitas dan lama kejutan dapat dilihat pada grafik dibawah.



Gambar 4.17 Grafik Hubungan Antara Lama Kejutan dan Viabilitas Sperma

Dari Grafik pada halaman sebelumnya, diketahui bahwa terjadi penurunan nilai viabilitas (tingkat kehidupan) dengan adanya penambahan lama kejutan (*Pulse length*). Jadi dapat disimpulkan bahwa perlakuan terbaik dengan menggunakan lama kejutan (*Pulse length*) 0,5 ms karena nilai viabilitas (tingkat kehidupan) tinggi. sedangkan perlakuan 1 ms nilai viabilitasnya rendah. Shimogori (2008) menyatakan bahwa peningkatan nilai mortalitas dapat terjadi karena pori-pori membran akan lebih lama menutupnya jika digunakan voltase yang tinggi dan lama kejutan yang panjang. Kondisi ini dapat menyebabkan pori membran sel tidak dapat menutup kembali sehingga sel akan mati.

Pada kejutan 4 kali, terjadi penurunan setengah dari kekuatan kejutan, sehingga akan berkurang panasnya pada kejutan keempat (Anonymous, 2009j). 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 menurun panasnya. Sebagai contoh, penurunan setengah dari kekuatan kejutan akan berkurang panasnya pada kejutan keempat (Anonymous, 2009j).

Nilai viabilitas tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x, sedangkan yang terendah terjadi pada perlakuan 1 ms 2x. Penurunan viabilitas pada perlakuan dapat terjadi karena pori-pori membran akan lebih lama menutupnya dengan menggunakan lama kejutan 1 ms. Kondisi membahayakan ini dapat menyebabkan pori membran sel tidak dapat menutup kembali, 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).

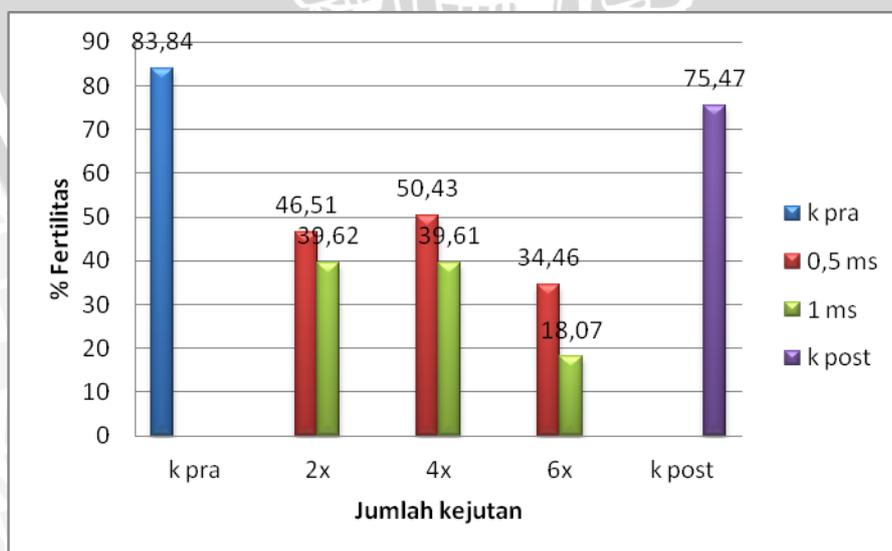
Penurunan nilai viabilitas dapat juga disebabkan oleh kenaikan suhu selama proses elektroporasi, hal ini mungkin terjadi karena sperma tercampur dengan Na-fisiologis (mengandung ion) dan juga dapat disebabkan pendinginan *cuvette* kurang maksimal. Untuk meningkatkan resistansi sampel dapat dilakukan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

semakin lama (*pulse length*) sehingga suhunya meningkat yang menyebabkan sperma mati (Anonymous, 2006a). Dengan demikian, mempertahankan suhu selama elektroporasi akan menjadi sangat penting bagi proses elektroporasi (Anonymous, 2006b). 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.

4.5 Fertilitas Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

Fertilitas adalah kemampuan sperma ikan untuk membuahi telur. Menurut Effendie (1997) fertilisasi merupakan proses bergabungnya inti spermatozoa dengan inti telur sitoplasma sehingga membentuk zigot. Fertilitas merupakan persentase keberhasilan proses penyatuan sel gamet jantan dan sel gamet betina untuk membentuk satu sel (zigot).

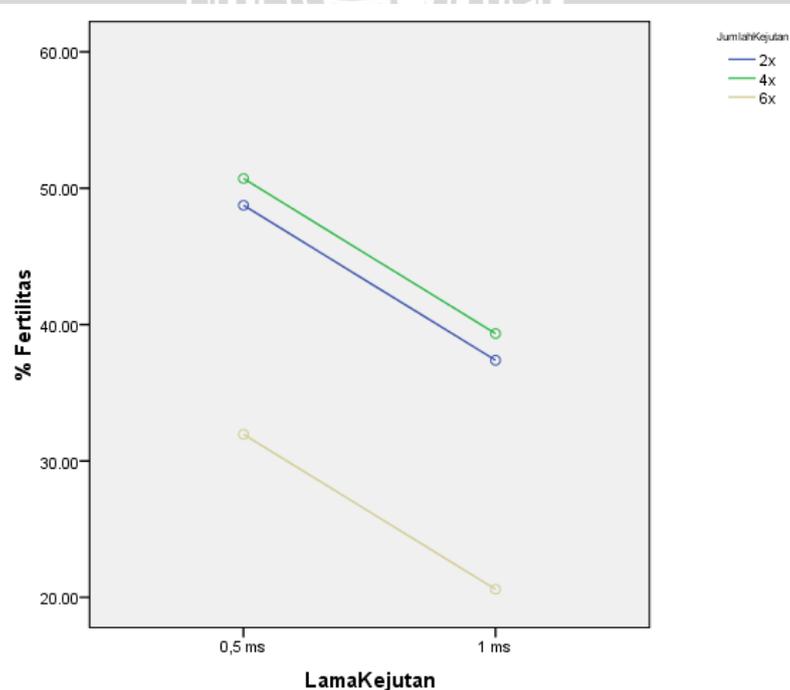
Untuk mengetahui nilai daya fertilitas ikan nilem Lebih jelasnya bisa diamati pada grafik persentase daya fertilitas pada gambar 4.18 dibawah.



Gambar 4.18 Grafik Daya Fertilitas

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah telur yang terfertilisasi oleh sperma, didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan lama kejutan 0,5 ms dan jumlah kejutan 4x sebesar 50,43% , sedangkan yang terendah terjadi pada perlakuan 1 ms dan jumlah kejutan 6x sebesar 18,07%. Dapat disimpulkan bahwa, suatu proses elektroporasi mempengaruhi kualitas dari sperma saat melakukan proses fertilisasi. Menurut Bakker *et al.* (2006), fertilitas pada ikan tergantung pada jumlah dan kualitas sperma. Perbedaan kemampuan fertilisasi berkaitan dengan beberapa faktor seperti perbedaan motilitas sperma, ukuran sperma, kecepatan dan laju metabolisme. Untuk mengetahui pengaruh daya fertilitas sperma perlakuan terhadap telur ikan nilem, maka dilakukan analisa sidik ragam dengan hasil ditunjukkan pada Lampiran 4.

Hasil perhitungan sidik ragam daya fertilitas menunjukkan Sig. perlakuan *pulse length* berbeda nyata terhadap daya fertilitas ikan nilem (*Osteochilus hasselti*), dengan nilai Sig. (0,022) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Sama halnya dengan lama kejutan (*pulse number*) memberikan nilai berbeda nyata terhadap fertilitas ikan nilem (*Osteochilus hasselti*), dengan nilai Sig.(0,010) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Grafik interaksi fertilitas dengan lama kejutan bisa diamati pada gambar di bawah ini.



Gambar 4.19 Grafik Hubungan Jumlah Kejutannya Daya Fertilitas

Dari gambar 4.19 diketahui bahwa terjadi penurunan nilai daya fertilitas seiring dengan penambahan lama kejutannya (*Pulse length*) serta penambahan jumlah kejutannya (*pulse number*). Pemberian lama kejutannya (*Pulse length*) 0,5 ms memberikan nilai daya fertilitas tertinggi daripada lama kejutannya 1 ms. Pada sperma yang dielektroporasi akan mengurangi kemampuan viabilitas dan fertilitas sperma. Karena pada saat analisa sperma yang dielektroporasi menggunakan mikroskop elektron ditemukan ekor sperma yang putus sampai ke mikrotubule filament (Sin *et al.*, 1993).

Jumlah kejutannya (*Pulse number*) juga memberikan pengaruh terhadap daya fertilitas. Namun pada jumlah kejutannya tertinggi terjadi penurunan daya fertilitas. Diketahui bahwa perlakuan jumlah kejutannya (*Pulse number*) 4x memberikan nilai daya fertilitas tertinggi dan terendah pada jumlah kejutannya 6x.

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 serta daya tahan sperma menurun setelah dielektroporasi. 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 fertilitas dan daya tetas, sama dengan yang telah ditunjukkan oleh tingginya daya fertilitas dan daya tetas setelah perlakuan elektroporasi (Collares, 2010).

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 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 $1,7 \times 10^9$ 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, kemudian ditambah air untuk mengaktifasi pergerakan sperma untuk membuahi telur. Menurut Hidayaturrohmah (2007), 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.

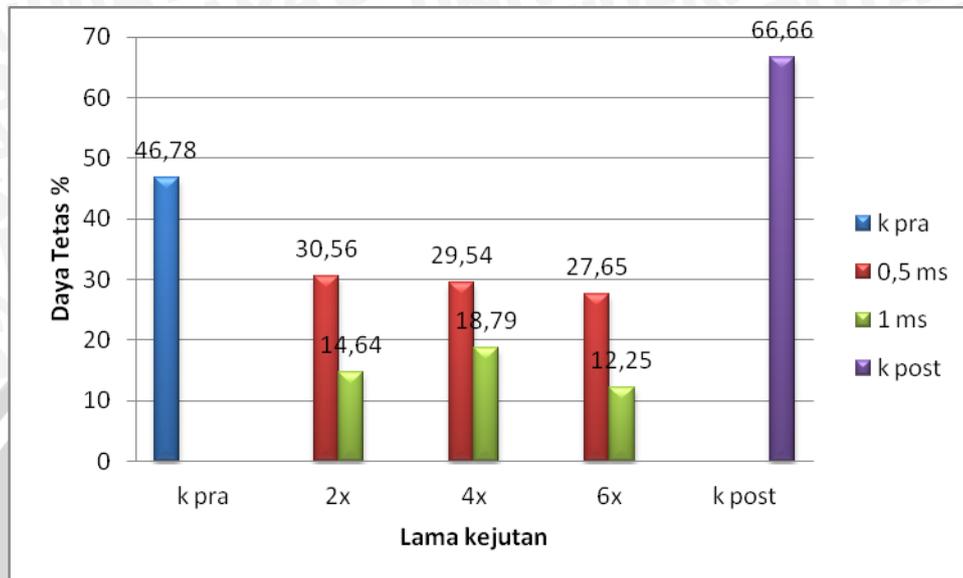
Banyak parameter yang dipergunakan untuk mengetahui biologi sperma, walaupun parameter motilitas biasanya digunakan untuk perkiraan kualitas dan daya fertilitas sperma (Cambeyron dan Zohar, 1990). Motilitas sperma dan daya fertilitas sperma merupakan parameter yang penting ketika digunakan untuk membandingkan sperma yang berbeda dan menilai kemampuannya untuk membuahi (fertilisasi) (Billard *et al.*, 1997).

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.

4.6 Daya Tetas Telur Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

Tingkat penetasan telur berhubungan erat dengan tingkat pembuahan telur. Sesuai dengan yang dinyatakan Oyen *et al.* (1991) bahwa daya tetas telur selalu ditentukan oleh tingkat pembuahan, kecuali ada faktor lingkungan yang mempengaruhinya, selanjutnya Masrizal dan Efrizal (1997), melaporkan bahwa derajat penetasan telur akan menurun dengan semakin menurunnya derajat pembuahan telur atau sebaliknya derajat penetasan akan meningkat dengan semakin meningkatnya derajat pembuahan.

Telur yang sudah terfertilisasi dan diamati perkembangannya hingga menetas sekitar 20-30 jam, menunjukkan analisa presentase daya tetas didapatkan data pada gambar 4.21. Hasil analisa grafik, nilai tertinggi terdapat pada lama kejutan 0,5 ms dan jumlah kejutan 2x sebesar 30,56% dan nilai paling rendah terdapat pada lama kejutan 6 ms dan jumlah kejutan 2 x sebesar 12,25 % Persentase daya tetas mengalami penurunan seiring dengan laju pertumbuhan telur yang sudah dibuahi. Hal tersebut berkaitan dengan kemampuan telur menerima GFP yang sudah terintegrasi dengan sperma. Menurut Tsai (2000), konsentrasi DNA yang digunakan untuk elektroporasi sperma mempengaruhi perbandingan daya tetas dan perbandingan transfer gen.



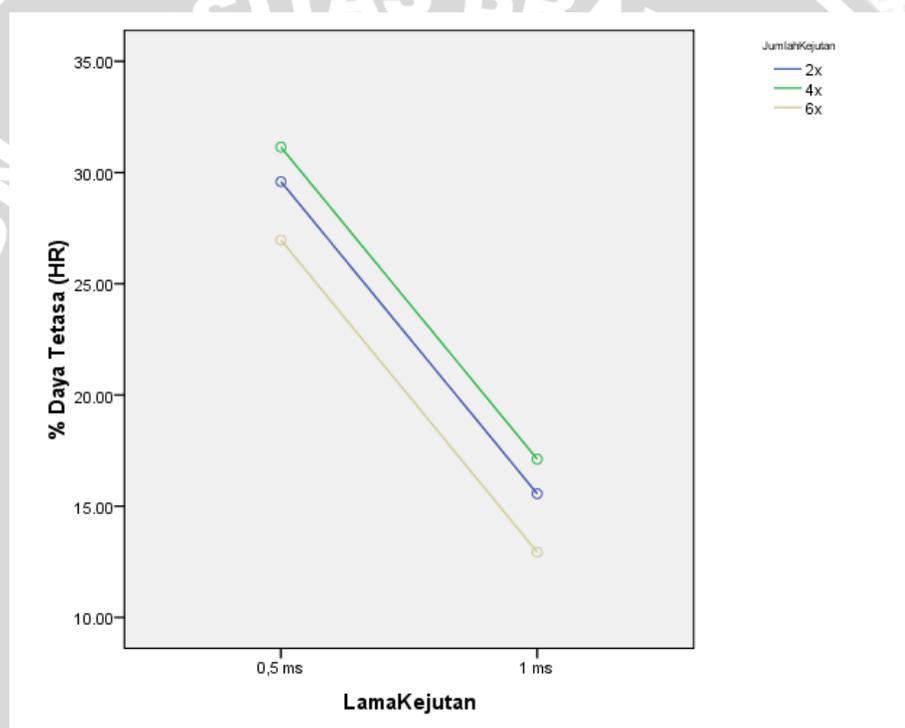
Gambar 4.20 Daya Tetas Telur Ikan Nilem

Dari nilai di atas, diketahui bahwa nilai persentase daya tetas cukup rendah. Rendahnya daya tetas, diduga disebabkan oleh beberapa faktor antara lain pengaruh guncangan air sewaktu perhitungan fertilitas dan aliran air yang terlalu besar pada wadah inkubasi. Sesuai dengan pernyataan Affandi dan Tang (2000) bahwa guncangan air dapat menurunkan keberhasilan fertilitas dan daya tetas telur. Selain itu menurut Yustina (2003) keberhasilan pembuahan sangat tergantung pada kualitas dan kuantitas sperma.

Selama proses gametogenesis, suhu sangat penting untuk keberhasilan pemijahan dan daya hidup telur. Kjorsvik *et al.*, (1990) menyimpulkan bahwa suhu penting untuk kualitas telur yang baik seperti pada ikan mas. Umumnya persentase penetasan ikan secara normal berkisar antara 50–80 % (Richter dan Rustidja, 1985). Rendahnya derajat penetasan telur ikan mas dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: kualitas telur, kualitas air media inkubasi

(penetasan). Untuk mengetahui nilai sidik ragam pada daya tetas ikan nilem (*Ostheochilus hasselti*) bisa dilihat pada lampiran 5.

Hasil perhitungan sidik ragam menunjukkan untuk perlakuan (lama kejutan) *Pulse Length* berbeda nyata, dengan nilai Sig. (0,010) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Sedangkan untuk perhitungan *Pulse Number* (lama kejutan) tidak berbeda nyata, dengan nilai Sig (0,723) < α , yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Interaksi Daya tetas dengan lama kejutan dapat dilihat pada gambar 4.21 di halaman berikut.



Gambar 4.21 Hubungan Antara Lama Kejutan dan Daya Tetas

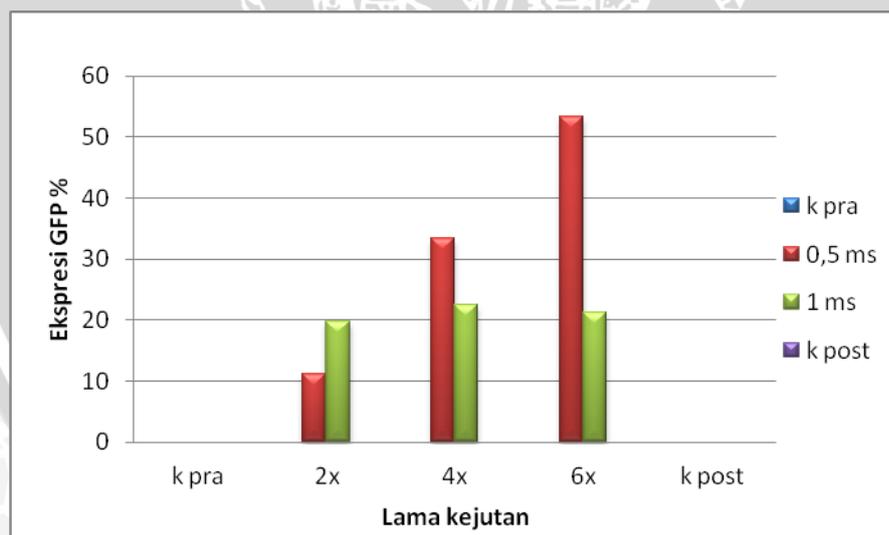
Hubungan antara Lama kejutan dan daya tetas menunjukkan adanya penurunan persentase seiring dengan meningkatnya lama kejutan (*pulse length*). Jadi semakin tinggi lama kejutan, maka semakin rendah daya tetasnya (*Hatching rate*). Menurut Yustina (2003) keberhasilan pembuahan sangat tergantung pada kualitas dan kuantitas sperma. Daya tetas meningkat ketika tekanan osmotik berbeda diterapkan pada sel sperma, yang menunjukkan bahwa elektroporasi

tidak berpengaruh pada HR. Survival rate lebih rendah ketika voltase kejutan dinaikkan. Menurut Tsai (2000), daya tetas embrio yang berasal dari fertilisasi hasil perlakuan elektroporasi sperma, menunjukkan penurunan secara drastis seiring penambahan voltase. Dia juga menambahkan bahwa hanya sedikit perbedaan daya tetas telur antara yang dibuahi dengan sperma elektroporasi dan sperma kontrol hanya selisih 4% lebih besar pada sperma kontrol. Selain itu, Kekurangan oksigen merupakan salah satu penyebab adanya kematian pada telur atau embrio yang sedang berkembang (Woynarovich dan Horvath, 1980).

4.7 Ekspresi Gen GFP

4.7.1 Ekspresi Gen GFP pada Sperma Ikan Nilem (*Osteichillus haselti*)

Ekspresi gen GFP pada sperma perlakuan menunjukkan intensitas dan integrasi GFP yang berbeda, sehingga bisa diketahui perlakuan elektroporasi optimal pada sperma. Lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 4.22 dibawah.



Gambar 4.22 Grafik Integrasi GFP Pada Inti Sperma

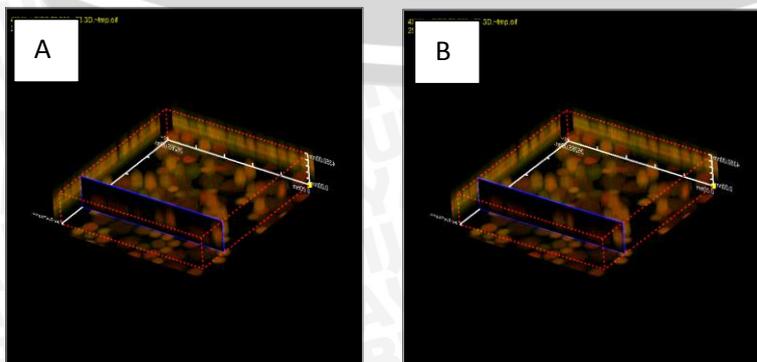
Pada grafik di atas menunjukkan jumlah kejutan dan lama kejutan mempengaruhi kemampuan GFP masuk sampai ke inti sperma. Dilihat persentase tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 53,25%. Sedangkan yang terendah terjadi pada perlakuan 0,5 ms 2x sebesar 11,11%. Sehingga bisa dikatakan,

semakin banyak jumlah kejutan yang diberikan, maka integrasi GFP ke inti sperma semakin besar. Hal ini menunjukkan lama kejutan mempengaruhi integrasi GFP ke dalam sperma. Rols dan Justin (1998) menyebutkan bahwa lama kejutan merupakan faktor yang sangat penting untuk kesuksesan transfeksi. Persentase Integrasi GFP pada sperma bisa dilihat pada tabel 4.6 di halaman berikutnya.

Tabel 4.1 Persentase Integrasi GFP pada Inti Sperma

PERLAKUAN	Sitoplasma	Inti	TOTAL	% Sperma Terintegrasi	Rerata %
0,5ms 2x u1	0	0	0	0	11,11
0,5 ms 2x u2	14	4	18	22,22	
0,5 ms 4x u1	27	20	47	42,55	33,03
0,5 ms 4x u2	39	12	51	23,52	
0,5 ms 6x u1	23	20	43	46,51	53,25
0,5 ms 6x u2	4	6	10	60	
1 ms 2x u1	18	6	27	22	19,69
1ms 2x u2	19	4	23	17,39	
1ms 4x u1	0	0	20	0	32,5
1ms 4x u2	9	13	20	65	
1ms 6x u1	0	0	43	0	21,29
1ms 6x u2	31	23	54	42,59	

Tabel diatas merupakan nilai persentase dari integrasi GFP ke dalam inti sperma. Dimana, jumlah kejutan sangat mempengaruhi efektifitas integrasi GFP ke dalam inti sperma. Pengamatan integrasi GFP hingga ke inti sperma bisa diketahui dengan indikasi pendaran warna oranye, dengan melihat gambar dengan potongan (slicing) pada setiap perlakuan dengan perpaduan warna dari GFP dan *Propidium Iodine* pada bagian tepi dan tengah (Gambar 4.23), dihalaman berikut.

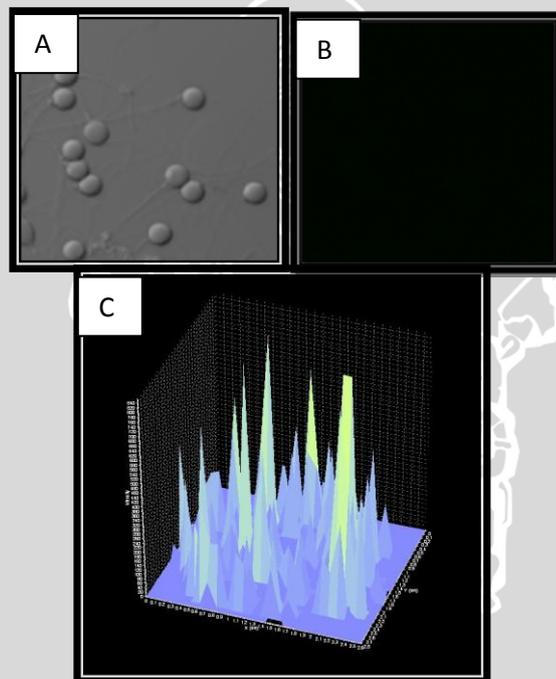


Gambar 4.23 Integrasi Sperma pada Perlakuan 0,5 ms 6x
A. Irisan pada Bagian Tepi Sperma
B. Irisan pada Bagian Tengah Sperma

Gambar diatas menunjukkan sperma ikan nilem yang terintegrasi dengan GFP. Pada gambar A di tandai dengan potongan pada tepi menunjukkan GFP masuk pada sitoplasma, sedangkan pada gambar B disampingnya merupakan potongan sperma pada tengah, menunjukkan adanya GFP yang masuk hingga ke inti dengan ditandai warna oranye menyala. Menurut Teissie' dan Ramos (1998), fusi sel tergantung pada jumlah kejutan. Pada kejutan lebih dari dua, fusi dari sel memiliki nilai yang tinggi yaitu 80% dan dari hasil pengamatan memiliki pengaruh yang maksimal. Ditambahkan pula oleh Anonymous (2009m) pada kejutan 4 kali, terjadi penurunan setengah dari kekuatan kejutan sehingga akan berkurang panasnya pada kejutan keempat. Jadi, jumlah kejutan memberikan pengaruh terhadap integrasi sperma hingga masuk ke inti sperma

Warna oranye pada pewarnaan sperma, akibat dari perpaduan antara warna GFP (hijau) dengan PI (merah). Semakin oranye sperma tersebut, maka semakin besar integrasi GFP ke inti. *Propidium iodide* (PI) adalah pewarna berpendar yang disisipkan didalam tepi asam nukleus. Sehingga, penggunaannya cukup luas untuk menilai sel mati atau untuk menentukan muatan DNA dalam analisa sel (Anonymous, 1999). Garner dan Lawrence (1995) menemukan bahwa kombinasi bahan pewarna DNA yaitu SYBR14 dan *Propidium Iodide* (PI) dapat digunakan untuk memperkirakan perbandingan sperma hidup dan mati pada sampel perlakuan sperma segar dan yang diawetkan. Dengan penambahan PI, *nucleus* sperma mati terwarnai dengan warna merah. Beberapa sperma yang hampir mati, terwarnai dengan warna keduanya (hijau dan merah). Proses integrasi GFP pada sperma bisa dilihat pada lampiran 9.

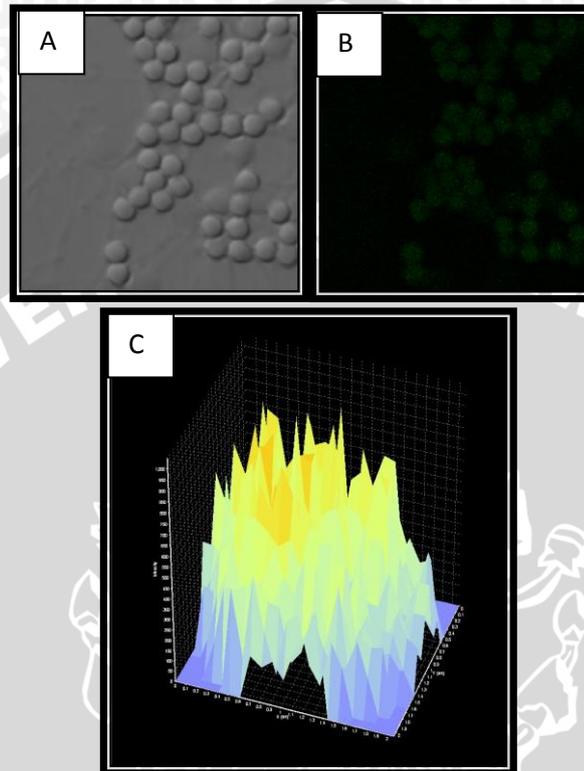
Pengamatan intensitas GFP menentukan berapa besar nilai pendaran yang terjadi pada sperma di setiap perlakuan. Pengamatan intensitas GFP pada sperma secara lengkap bisa diamati pada lampiran 7. Untuk analisa sperma kontrol, ditemukan adanya sedikit intensitas pendaran GFP sebesar 500 *Arbitrary* (Gambar 2.24). Meskipun tidak dilakukan proses elektroporasi, namun masih ada sedikit pendaran hijau, yang merupakan *autofluorescence*. *Autofluorescent* adalah pendaran alami (biasanya terlihat pada kultur jaringan hidup), sebagian besar terdiri atas *flavins* dan *porphyrins* serta pada tumbuhan yaitu klorofil (Anonymous, 2009!). Menurut Diningrum (2011), adanya autofluorescence juga terdapat pada sperma ikan mas.



Gambar 4.24 Ekspresi Sperma Kontrol dengan Perbesaran 2400x
A. Tampilan sperma pada Mikroskop Inverted
B. Tampilan sperma pada Layar Fluorescence
C. Grafik Intensitas Sperma Kontrol

Hasil analisa intensitas pendaran GFP pada sperma yang mencapai inti didapatkan hasil terbaik pada perlakuan 0,5 ms 6x, persentase integrasi GFP mencapai 53,25 % dengan intensitas sebesar 1900 *Arbitrary* (Gambar 4.25) Sedangkan hasil yang terendah terjadi pada perlakuan 0,5 ms 2x persentase

integrasi GFP sebesar 11,11 % dengan intensitas sebesar 650 *Arbitrary* (Gambar 4.26). penampilan warna pada gambar intensitas sperma menunjukkan nilai yang berbeda. Warna biru menunjukkan intensitas rendah, warna hijau menunjukkan intensitas sedang, dan warna kuning menunjukkan intensitas tinggi.

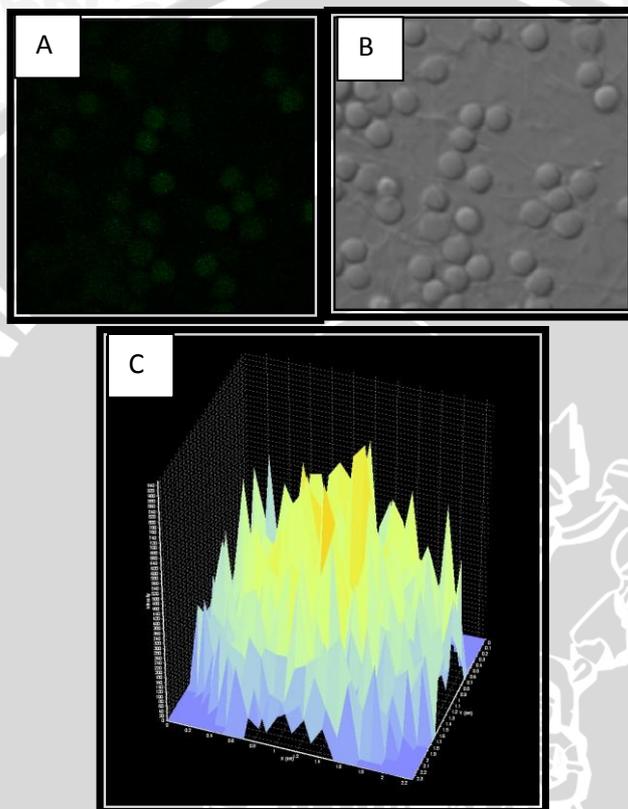


Gambar 4.25 Ekspresi Sperma pada Perlakuan 0,5 ms 6x Perbesaran 2400x
A. Tampilan Sperma pada Mikroskop Inverted
B. Tampilan Sperma pada Mikroskop Fluorescence
C. Grafik Intensitas Pendaran GFP

Semakin banyak jumlah kejutan, maka integrasi GFP ke inti semakin besar. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan sin (1998), bahwa lama kejutan dan jumlah kejutan yang tinggi lebih efektif untuk transfer gen dengan DNA konsentrasi rendah. Teissie' dan Ramos (1998) mengatakan, fusi sel tergantung pada jumlah kejutan. Pada kejutan lebih dari dua, fusi dari sel memiliki nilai yang tinggi yaitu 80% dan dari hasil pengamatan memiliki pengaruh yang maksimal terhadap kenaikan jumlah kejutan. Ditambahkan Symonds *et al.* (1994), bahwa efisiensi

DNA pada elektroporasi sperma bergantung pada Voltase, jumlah kejutan dan konsentrasi DNA

Ekspresi GFP pada sperma dengan perlakuan 0,5 ms 2x, menghasilkan integrasi GFP ke sperma kurang maksimal. Ditunjukkan pada grafik 4.26 dengan penampilan warna kuning sebagai intensitas tertinggi sebesar 650 *Arbitrary*.



Gambar 4.26 Ekspresi GFP pada Perlakuan 0,5 ms 2x Perbesaran 2400x
A. Tampilan Sperma pada Mikroskop Inverted
B. Tampilan Sperma pada Mikroskop Flourescence
C. Grafik Intensitas Pendaran GFP

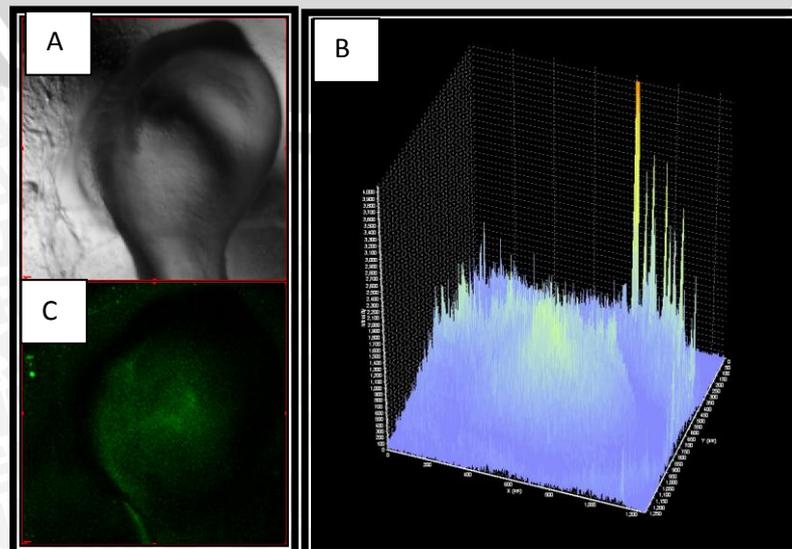
Anderson dan Evans (1988), menyatakan bahwa efektifitas transfer gen melalui elektroporasi bergantung pada jumlah kejutan dan parameter biologi. Sehingga efektifitas integrasi GFP hingga ke inti sperma bergantung pada jumlah kejutan, lama kejutan dan konsentrasi GFP. Semakin banyak jumlah kejutan, maka semakin besar GFP yang masuk ke inti sperma.

. Nilai intensitas pendaran terendah terjadi pada perlakuan 0,5 ms 2x. Lebih jelasnya bisa diamati pada gambar 4.27 di halaman berikut. Dengan demikian,

pada pengamatan intensitas pendaran GFP menunjukkan, elektroporasi dengan perlakuan 0,5 ms 6x menghasilkan intensitas pendaran lebih besar, sedangkan perlakuan 0,5 ms 2x hasil pendaran GFP kecil. Untuk mengetahui perhitungan analisa sidik ragam, dapat dilihat pada lampiran 6. Hasil dari analisa sidik ragam menghasilkan nilai perlakuan *pulse length* Sig. (0,575) > α , sedangkan (*pulse number*) dengan Sig. (0,424) > α , yang berarti keduanya tidak memberikan pengaruh berbeda nyata atau menerima H_0 menolak H_1 . Sehingga bisa dikatakan, penggunaan metode elektroporasi dengan perlakuan Lama kejutan dan jumlah kejutan yang berbeda, cukup efektif dalam integrasi GFP pada sperma.

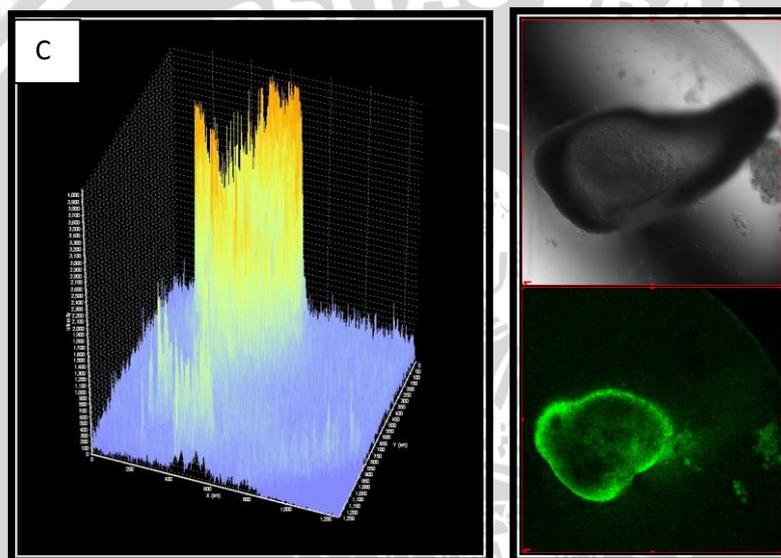
4.7.2 Ekspresi Gen GFP pada Embrio Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

Intensitas GFP dalam embrio mengalami perubahan seiring pertumbuhan oosit menjadi larva yang siap menetas. Pada gambar 4.27, yaitu pada embrio kontrol masih menunjukkan adanya ekspresi GFP sebesar 800 *Arbitrary*, hal ini masih menunjukkan adanya Autofluorescence. *Autofluorescent* adalah pendaran alami, sebagian besar terdiri dari flavins dan porphyrins. Pada hasil penelitian Prausnitz *et al.* (1993) pada perlakuan kontrol menunjukkan bayangan dengan pendaran lemah, hal tersebut disebabkan oleh kombinasi *autofluorescent*, latar belakang dari ikatan permukaan *fluorescence*. intensitas pendaran GFP pada embrio bisa dilihat pada lampiran 10 dan 11.



Gambar 4.27 Ekspresi Embrio Kontrol dengan Perbesaran 50x
 A. Tampilan Embrio pada Mikroskop Inverted
 B. Tampilan Embrio pada Mikroskop Flourescence
 C. Grafik Intensitas Pendaran GFP

Hasil pendaran tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x, dengan intensitas sebesar 3950 *Arbitrary* (4.28). Sedangkan pendaran terendah terjadi pada perlakuan 1 ms 4x dengan intensitas sebesar 1200 *Arbitrary* (Gambar 4.29).

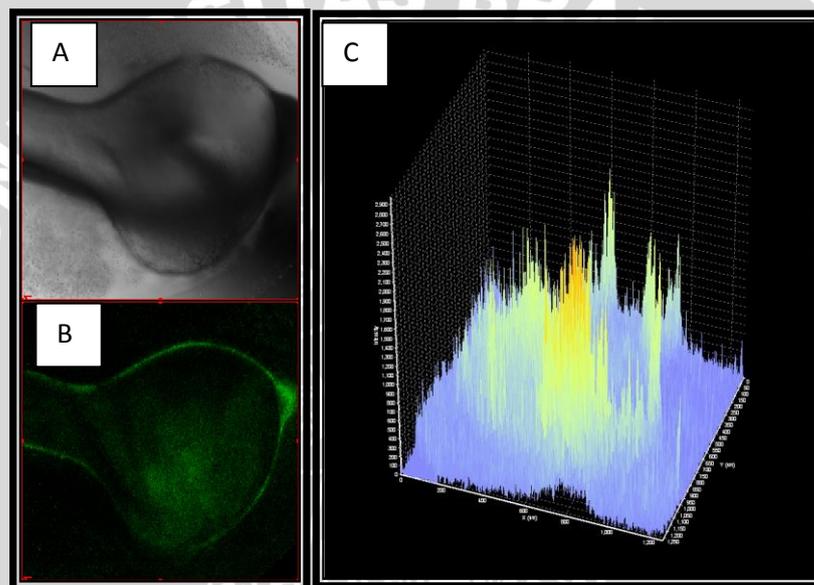


Gambar 4.28 Ekspresi Embrio Perlakuan 0,5 ms 4x Perbesaran 50x
 A. Tampilan Embrio pada Mikroskop Inverted
 B. Tampilan Embrio pada Mikroskop Flourescence
 C. Grafik Intensitas Pendaran GFP

Perbedaan intensitas GFP pada tiap embrio, salah satunya akibat dari perbedaan perlakuan pada sperma sebelum fertilisasi. Selain itu penggunaan marker dalam penelitian ini adalah GFP sangat sesuai untuk diaplikasikan pada sperma ikan (Power *et al.*, 1995). pada penelitian (Maclean dan Penman, 1990) menyebutkan, jika sebuah konstruksi DNA terintegrasi pada sel, semua jaringan pada tiap sel sedikitnya akan membawa gen baru. Namun seiring berkembangnya spesies, gen tersebut akan mengalami penurunan. (Buchanan *et al.*, 2001) menambahkan, penggunaan *marker* (gen penanda) yang sesuai

untuk transfer gen pada jaringan termasuk embrio, dimana beberapa sel menunjukkan resistensinya pada DNA pilihan, tapi yang lainnya mengalami kematian. Jadi bisa dikatakan, perbedaan intensitas pendaran GFP pada embrio akibat perbedaan perlakuan elektroporasi serta kualitas dari embrio tersebut untuk berkembang.

Samarsik *et al.* (2002) menunjukkan bahwa sekitar 50% daya tetas telur yang sudah dielektroporasi, hanya sekitar 5-10% hewan membawa DNA bertahan hingga berumur 4 bulan.



Gambar 4.29 Ekspresi Embrio Perlakuan 1 ms 4x Perbesaran 50x

- A. Tampilan Embrio pada Mikroskop Inverted
- B. Tampilan Embrio pada Mikroskop Fluorescence
- C. Grafik Intensitas Pendaran GFP

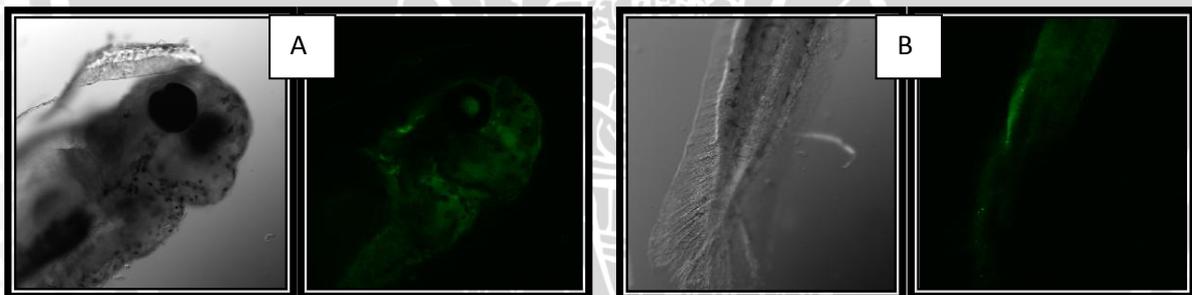
Hasil pengamatan menunjukkan, hampir semua embrio terindikasi adanya GFP. Karena embrio ikan nilam cukup besar, maka perbesaran pada mikroskop konvokal menggunakan perbesaran 50x. Dari hasil analisa data, menunjukkan bahwa GFP mampu terekspresi pada embrio hingga menghasilkan warna hijau akibat protein gugus *chromophore*. Data intensitas GFP pada embrio dapat dilihat pada lampiran 10.

Menurut Prasher (1995), GFP adalah protein unik dari 238 asam amino yang terbentuk oleh *chromophore* dari tiga asam amino dalam struktur asli dan

berbeda dengan molekul *bioluminescent* lainnya, beroperasi bebas dari faktor yang mendukung. Menurut Cubitt *et al.* (1995) *chromophore* dibentuk atas modifikasi dari *serin*, *dehydrotyrosine* dan *glisin* pada posisi 65-67 dalam rangkaian polipeptida.

4.7.3 Ekspresi Gen GFP pada Larva Ikan Nilem (*Osteochilus haseltii*)

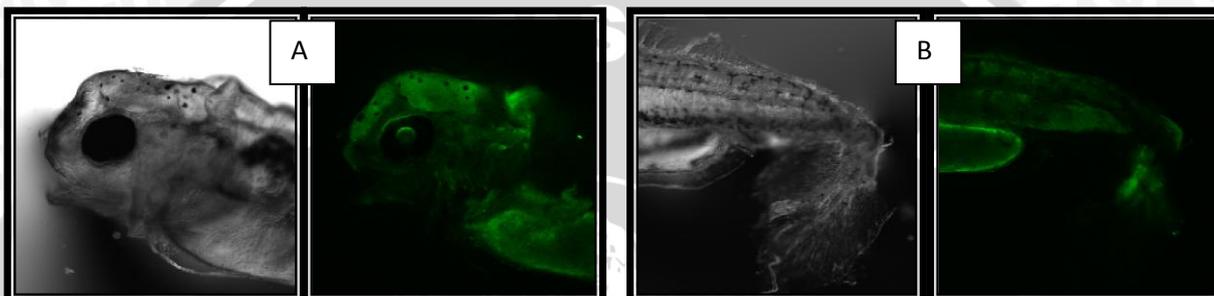
Pengamatan ekspresi gen GFP dilakukan untuk mengetahui intensitas pendaran GFP setelah telur menetas. Pada umumnya efektifitas GFP yang sudah terintegrasi di sperma mengalami pengurangan seiring pertumbuhan sel telur yang terfertilisasi hingga telur menetas. Pada larva kontrol masih menunjukkan adanya sedikit pendaran GFP, hal itu disebabkan adanya sedikit *autofluorescence* (gambar 4.30). Sehingga bisa dipastikan pada larva perlakuan terjadi pendaran GFP. Untuk mengetahui hasil keseluruhan pengamatan intensitas GFP pada larva, dapat dilihat pada lampiran 12.



Gambar 4.30 Pendaran GFP pada Larva Kontrol Perbesaran 50x
A. Bagian Kepala dan Perut
B. Bagian Ekor

Intensitas pendaran GFP pada sperma kontrol pada bagian kepala dan badan sebesar 2900 *Arbitrary*, sedangkan pada bagian ekor mencapai 1800 *Arbitrary*. Pada larva perlakuan, intensitas pendaran tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5ms 6x pada kepala dan perut sebesar 3300 *Arbitrary*, sedangkan ekor sebesar 2300 *Arbitrary* (gambar 4.31).

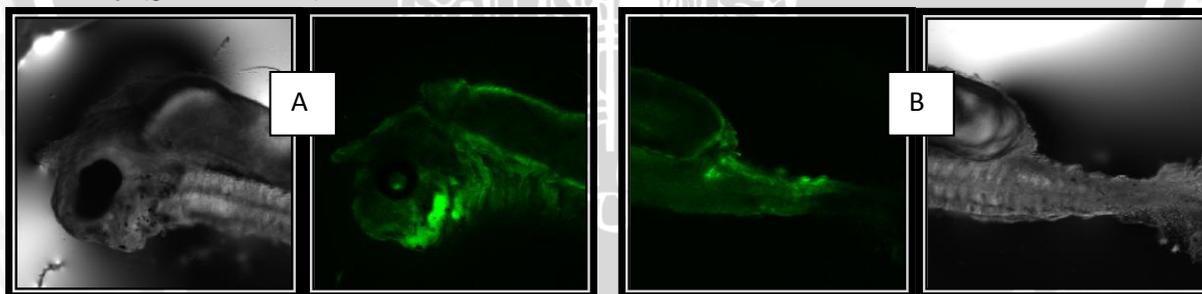
Pendaran yang terjadi pada perlakuan 0,5 ms 6x menunjukkan intensitas GFP pada kepala dan perut lebih besar dari pada bagian ekor. Pada bagian kepala dan perut terdapat banyak jaringan saraf maupun organ yang merupakan bagian paling dominan dalam pengikatan GFP. Sedangkan pada bagian ekor hanya sedikit jaringan dan pembuluh darah. Menurut Megason dan McMahon (2000), efisiensi ekspresi GFP pada jaringan lebih banyak terjadi pada jaringan sel saraf dan mata hingga mencapai lebih dari 95%.



Gambar 4.31 Pendaran GFP pada Larva Perlakuan 0,5 ms 6x Perbesaran 50x

- A. Bagian Kepala dan Perut
- B. Bagian Ekor

Pendaran terendah terjadi pada perlakuan 1 ms 2x dengan intensitas pada kepala dan perut sebesar 2500 *arbitrary* sedangkan pada ekor sebesar 2300 *arbitrary* (gambar 4.32).



Gambar 4.32 Pendaran GFP pada Larva Perlakuan 1 ms 2x Perbesaran 50x

- A. Bagian Kepala dan Perut
- B. Bagian Ekor

Hasil analisa pendaran GFP pada larva perlakuan menunjukkan, pada usia 30 jam ekspresi GFP masih tampak. Hal tersebut menandakan pengaruh dari kualitas konstruksi gen, berupa konstruksi plasmid sirkuler dengan β -actin medaka sebagai promoter dan hrGFP sebagai gen target. Promoter merupakan

salah satu faktor penentu dalam teknologi transgenesis (Fariduddin, 2009). Sedangkan menurut (Alimuddin, 2009), promotor sebagai regulator ekspresi gen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan transgenesis. Penggunaan promotor ini sesuai dengan kebutuhan spesies yang dipakai dalam transfer gen karena memiliki keunggulan. Menurut Volckaert (1994), promotor β -actin memiliki beberapa sifat yang terkait dengan aktifitas elemen-elemennya yaitu *constitutive*, *ubiquitous* dan *house keeping*. *Constitutive* berarti promotor ini mampu aktif tanpa membutuhkan faktor pemicu seperti rangsangan hormon atau rangsangan suhu. Promotor β -actin bersifat *ubiquitous* (terdapat dimana-mana) artinya dapat aktif pada semua jaringan otot. Sedangkan bersifat *house keeping* berarti promotor β -actin dapat aktif kapan saja bila diperlukan (Purwanti, 2007).

4.8 Kualitas Air

Masa pemeliharaan telur selama pertumbuhan dilakukan pada bak inkubator yang sudah disterilisasikan sebelumnya, baik alat maupun bahan yang digunakan dalam pengamatan pertumbuhan telur ikan nilem. Selain itu, kondisi kualitas air juga diperhatikan dalam proses penetasan telur ikan nilem.

Kualitas air mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup biota air yang dipelihara, oleh karena itu, kualitas air harus berada pada kondisii optimum. Dengan demikian perubahan kualitas air harus selalu dipantau. Agar perubahan kualitas air diketahui (Ghufran dan Andi, 2002). Kualitas air yang diukur pada penelitian ini meliputi suhu, pH dan DO. Secara keseluruhan nilai kualitas air masih berada pada kisaran normal yang mendukung kehidupan ikan nilem.

a. Suhu

Selama masa inkubasi pada bak inkubator, pengukuran suhu dilakukan selama 2 kali pada pukul 06.00 dan 15.00. Untuk menjaga kestabilan suhu, dipasang 3 buah heater pada sekitar bak penampungan. kisaran suhu air yang diperoleh

berubah-ubah. Yaitu antara 27°C sampai 28°C pada pagi hari, sedangkan pada sore hari sekitar 28°C sampai 30°C.

b. pH

Nilai pH didefinisikan sebagai negatif logaritma dari konsentrasi ion hidrogen dan nilai asam yang ditunjukkan dengan nilai 1 s/d 7 dan basa 7 s/d 14. (Goldman dan Horne,1983). Nilai pH pada bak inkubator berkisar antara 7,56 sampai 7,61.

c. DO (Oksigen Terlarut)

Kandungan DO yang ada pada bak inkubator antara 4,42 sampai 5,80 mg/l. Pescod (1973), menyatakan bahwa kandungan oksigen terlarut 2 mg/L dalam perairan sudah cukup untuk mendukung kehidupan biota akuatik, asalkan perairan tersebut tidak mengandung bahan-bahan yang bersifat racun sedangkan Banarjea (1967), menyatakan bahwa perairan dengan oksigen terlarut lebih dari 7 mg/L adalah tergolong produktif. Kordi (2007) menambahkan, konsentrasi oksigen yang baik dalam budidaya perairan adalah antara 5-7 ppm .

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, kesimpulan yang didapatkan antara lain :

- Pemberian kejutan 40 volt dengan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) memberikan pengaruh motilitas dengan nilai tertinggi sebesar 85% pada perlakuan 1 ms 2x, sedangkan, nilai viabilitas terbaik pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 64,99%, sedangkan daya fertilitas nilai tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 50,43%, namun kualitas daya tetas menurun sebesar 30,56% pada perlakuan 0,5 ms 2x.
- Transfer GFP dengan metode elektroporasi menghasilkan pendaran intensitas sperma tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 1900 *arbitrary*, pada embrio nilai tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 3950 *arbitrary* serta larva nilai tertinggi sebesar 3300 *arbitrary* pada kepala dan perut, sedangkan pada bagian ekor sebesar 2300 dengan perlakuan 0,5 ms 6x.
- Integrasi GFP pada sperma dengan nilai tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 53,25%
- Kualitas air pada bak inkubator berada pada kisaran normal. Untuk suhu 27-30 °C, pH 7,61 sedangkan DO sebesar 4,42 sampai 5,80 mg/l.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disarankan bahwa pada proses pembuatan ikan transgenik berdasarkan metode elektroporasi sebaiknya menggunakan tegangan 40 volt, lama kejutan 0,5ms dan jumlah kejutan 6x dengan konsentrasi DNA (GFP) 60 ng sebagai gen marker.

DAFTAR PUSTAKA

- Achjar ,M dan Rismunandar. 1986. **Perikanan Darat**. CV. Sinar Baru. Bandung.
- Adewumi, B.A., ademosun, O.C., dan Ogunlowo, A.S. 2005. **Research contributions to the development of a small/medium scale legume thresher**. Book of abstract of the International Conference on Science and technology, federal University of Technlogy Akure, Nigeria.
- Afandi, R dan Tang, U.M. 2000. **Biologi Reproduksi Ikan**. Laporan. Pekanbaru: Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan Perairan. 39 halaman.
- Agung, M.U.K., Haetami, P., dan Mulyani, Y. 2007. **Penelitian Dasar (LITSAR) UNPAD Penggunaan Limbah Kiambang Jenis *Duckweeds* dan *Azola* dalam Pakan dan Implikasinya pada Ikan Nilem**. LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS PADJADJARAN, Bandung. 32 halaman.
- Alimuddin, M.H., Fariduddin Ath-thar, L.I Purwanti, dan Odang Carman. 2009. **Promoter β -actin Ikan Medaka (*Oryzias latipes*) dapat digunakan untuk Membuat Ikan Lele dan Ikan Mas Transgenik**.
- _____, Octavera, A., Arifin O.Z., dan Sumantadinata, K .2008. **Karakterisasi Promoter β -actin ikan nila *Oreochromis niloticus***. Jurnal Akuakultur Indonesia 7(2):115-127.
- Amann, R.P., Graham, J.K.1992. **Spermatozoal Function**. In: Mckinnon AO, Vos JL (eds)., Equine Reproduction. Philadelphia: Williams and Wilkins. Halaman 715-745.
- Andreason, G.L., Evans, G.A.1988. **Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation**. Biotechniques 6:650 660.
- Andreason, G.L., Evans, G.A. 1989. **Optimization of electroporation for transfection of mammalian cells**, Anal. Biochem. 180:269-275.
- Andreeva, L.E., Sleptsova, L.A., Grigorenko, A.P., Gavriushkin, A.V., dan Kuznetsov A.V. 2003. **Loach Spermatozoa Transfer Foreign DNA, Which Expression is Discovered in the Early Development Stages Journal of Genetics**. Russian. V. 39(6):758-761.
- Anonymous, 2009a. **Nilem (*Osteochilus hasselti*)**. <http://gandainc.blogspot.com> Diakses pada tanggal 2 Februari 2011.
- _____, 2009b. **Bioteknologi**.<http://www.tedi.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 2 februari 2011.
- _____. 2009c. **Rekayasa Genetika**. Diakses dari <http://elearning.unej.ac.id>.
- _____. 2009d. **Promotor**. Diakses dari <http://en.wikipedia.org/wiki/Promoter>.

_____. 2009f. **Confocal Laser Scanning Microscopy**. Diakses dari http://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_laser_scanning_microscopy

_____. 2009g. **Pulse agile[®] Electroporation**. Cyto Pulse Sciences. Inc

_____. 2009h. **537059 Propidium Iodide**. Miltenyi Biotec.inc

Anonymous.2006a. **Mesin Canggih Berbahan Bakar Gula**. <http://www.harunyahya.com>.

_____. 2006b. **Gene Pulser Xcell Electroporation System**. Instruction Manual. BIORAD.

_____. 1999. **Propidium Iodide Nucleic Acid Stain**. Molecular Probes, Inc. All rights reserved. Diakses di <http://www.probes.com>. Pada tanggal 12 Februari 2011.

Arifiantini, R.I., T.I Yusuf., dan O. Indah.2005. **Kaji Banding Dua Teknik Pengemasan Menggunakan Tiga Macam Pengencer untuk Pembekuan Semen Sapi Friesian Holstein (FH)**. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2005. Halaman 366-376.

Assubaki, I. 2002. **Pengaruh Penggunaan Hormon Ovaprim dengan Dosis yang Berbeda Terhadap Waktu Latensi Pemijahan Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)**. Diakses <http://digilib.gunadarma.ac.id> pada tanggal 16 Januari 2011.

Ath-Thar, M.F. 2007. **Efektivitas Promoter β -actin Ikan Medaka (*Oryzias latipes*) dengan Penanda Gen hrgfp (*humanized renilla reniformis green fluorescent Protein*) pada ikan Lele (*Clarias gariepinus*) Keturunan f0**. Departemen Budidaya Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.

Bakker, Theo C.M., Marc Zbinden., Joachim G Frommen., Alexander Weiss., dan Carlo R Largiadèr. 2006. **Potential effects of sea level rise on the terrestrial habitats of endangered and endemic megafauna it the Northwestern Hawaiian Islands**. Endagered Species Res.. UK. 2:21-30

Bailey, J.L., dan Buhr, M.M. 1994. **Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of Bovine Spermatozoa**. Can J Anim Sci: 74: 45-51.

Banarjea, S.M. 1967. **Water Quality and Soil Condition of Fish Pond in Some Stages of India in Relation to Fish Production**, Indian J. Fish. 14 halama.

_____.1978. **Changes in Structure and Fertilizing Ability of Marine and Freswater Fish Spermatozoa Diluted in Media of Various Salinities** *Aquaculture* 14: 187 - 198.

_____, Cosson, J., Crim, L.W., dan Suquet, M. 1995 **Sperm physiology and quality**. In: **Broodstock management and egg and larval quality** (ed. by N.R. Bromage & R.J. Roberts), , Cambridge University Press, Cambridge. Halaman 53-76

Beaumont, A.R., dan K. Hoare. 2003. **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture**. School of Ocean Sciences. University of Wales. Bangor, UK. Halaman 127-140

Buchanan, J.T., Nickens, A.D., Cooper, R.K., dan Tiersch, T.R. 2001. **Transfection of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) embryos**. Marine Biotechnology. 3: 322-335.

Chalfie, M Tu, Y Euskirchen, G Ward, WW and Prasher, DC .1994. **Gene Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression**. Science 263:802-805.

Chambeyron, F., dan Zohar, Y.1990. **A Diluent for Sperm Cryopreservation of Gilthead Sea Bream, *Sparus auratus***. Aquaculture,90:354-352.

Chao, N.H., H.P. Tsai, dan I.C. Liao.1992. **Short and Long-term Cryopreservation of Sperm and Sperm Suspension of the Grouper, *Ephinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider)**. Journal Asian Fisheries Science 5:103-116.

Chen, C. A., Wallace, C.C., dan Wolstenholme, J. 2002. **Analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals**. Mol. Phylogenet. Evol. 23:137–149.

Chourrout, D., Guyomard, R., dan Houdebine, L.M.1986. **High efficiency Gene Transfer in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) by Microinjection into Egg Cytoplasm**. Aquaculture 51:143–150.

Chun, C.Z., dan Chen, T.T. 2004. **Disruption of embryonic development by the Ea4-peptide of rainbow trout in medaka (*Oryzia latipes*)**. Zebrafish 1: 227–238.

Collares Tiago, Vinicius Farias Campos, Fabiana Kommling Sixas, Paulo V Cavalcani, Odira Dellagostini, Heden Luiz M Moreira, dan 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.

Cosson, J. 2008. **Methods to analyse the movements of fish spermatozoa and their flagella**. In: Alavi S.M.H., Cosson J.J., Coward K., Rafee G. (eds.): Fish Spermatology. Alpha Science Ltd., Oxford, UK. Halaman 63–102.

Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., dan Tsien, R. Y.1995. **Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins**. TIBS 20:448–455.

Djuhanda dan Tatang.1981. **Dunia Ikan**. Armico, Bandung. 86 halaman.

Dude, E. J., dan Satya, N. M. 1995. **Statistika Matematika Modern**. Penerbit ITB. Bandung.

Dunham, Rex A. 2004. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology**. Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University. Alabama. USA. Halaman 161-165

Effendie, M.I.1979. **Biologi Perikanan Cetakan I**. Yayasan Dewi Sri, Bogor. 98 halaman

_____.1997. **Biologi Perikanan**. Yayasan Pustaka Nusantara, Yogyakarta. Halaman 50–71.

Farid, Atmadiwiryana. 2007. **Mikroskop Pemindai Berteknologi Laser di Unibraw**. Diakses dari : www.google.com

Felts, K., Rogers, B., Chen, K., Ji, H., Sorge, J., dan Vaillancourt, P.2001. **Recombinant *Renilla reniformis* GFP Displays Low Toxicity**. *Stratagene* 13:85-87.

Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Davies, P.L., dan Hew, C.L. 1988. **Evidence for Antifreeze Protein Gene Transfer in Atlantic Salmon (*Salmosalar*)**. *Can J Fish Aquat Sci* 45:352–357.

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 Vitro Matured Bovine Oocytes on In Vitro Development of Embryos**. *Biol of reproduction*. Halaman 44 : 76.

Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Richardson, L., Brown, C.R., dan Moor, R.M.1989. **Characterization of Protein Secreted by Sheep Oviduct Epithelial Cells and their Function in Embryonic Development**. *Development* 106: 303-312

Garner, D.L., dan E.S.E. Hafez. 2000. **Spermatozoa and Seminal Plasma**. In: B. Hafez/ E.S.E. Hafez (eds.). *Reproduction in Farm Animal* 7th Ed. Lippicott Williams & Wilkins. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hongkong, Sydney, Tokyo. Halaman 96-109

_____, Lawrence, dan A. Johnson. 1995. **Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR14 and Propidium Iodide**. *Biology of Reproduction* 53: 276-284

Ginzburg, A.S., 1972. **Fertilization in Fish and Problem of Polyspermy**. Keter Press, Ferusalem. Halaman 87-14.

Glick, B.R., dan Pasternak, J.J.2003. **Molecular Biotechnology :Principles and Applications of Recombinant DNA**. Third ed. ASM Press. Washington DC.

Golzio, M., Teissie, J., dan Rols, M.P. 2002. **Direct Visualization At the Single-Cell Level Of Electrically Mediated Gene Delivery**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 5;99(3):1292-7

_____, P. Mora., C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissei, dan 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.

Gong, Z., Ju, B., Wang, X., He, J., Wan, H., Sudha, P.M., dan Yan, T. 2002. **Green Fluorescent Protein Expression in Germ Line Transmitted Transgenic Zebrafish Under a Stratified Epithelial Promoter from Keratin 8.** *Developmental Dynamics* 223: 204-215.

Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Barbosa, dan F.H. Ruddle. 1980. **Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 77:7380-7384.

Gufran dan Andi, B. 2002. **Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan.** Rineka Cipta. Jakarta. 208 halaman.

Gusrina. 2008. **Budidaya Ikan Jilid 1 untuk SMK.** Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan, Direktorat Jenderal Manajemen Pendidikan Dasar dan Menengah, Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta. 140 halaman

Hackett, P.B. 1993. **The Molecular Biology of Transgenic Fish.** In: Hocachka and Mommsen (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* Elsevier Science Publishers BV. Vol. 2 :218-221.

Hafez, B., dan Hafez, E.S.E. 2000. **Reproductive Cycles dalam Reproduction in Farm Animals.** 7th Ed. Hafez ESE (Editor). Philadelphia : Lippincott Williams Wilkins

Handarini, Ristika. 2001. Ternak Transgenik: Prosedur, Bioetika dan Keamanannya. Diakses dari : <http://www.rudyct.com/PPS702-ipb/02201/ristika.htm>

Hardjamulia, A. 1979. **Budidaya Perikanan. Budiadaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*), Ikan Tawes (*Puntius javanicus*), dan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*).** SUPM Bogor. Badan Pendidikan, Latihan pertanian dan Penyuluhan Pertanian. Departemen Pertanian. Halaman 1-7.

Hasan, Iqbal. 2002. **Pokok-Pokok Materi Metodologi Penelitian Dan Aplikasinya.** Ghalia Indonesia. Jakarta. 260 halaman.

Harvey, B.J., dan W.S. Hoar. 1979. **The Theory and Practice of Induced Breeding in Fish.** IDRC-21e, Ottawa. Halaman 1-48

Heim, R., Prasher, D.C., dan Tsien, R.Y. 1994. **Wavelength Mutation and Post-Translational Modification of Green Fluorescent Protein.** *Proceedings National Academy of Science USA.* 91:12501-12504

Herman. 2009. **Perakitan Tanaman Tahan Serangga Hama Melalui Rekayasa Genetika.** *Buletin Agrobio* Vol 5: No 1 Halaman 1-13.

Hidayaturrahmah. 2007. **Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa.** Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lambung Mangkurat. BIOSCIENTIAE. Volume 4, Nomor 1, Januari 2007, Halaman 9-18. <http://www.unlam.ac.id/bioscientiae/>

Higashijima, Shin-ichi., Hitoshio Okamoto., Naoto Ueno., Yoshiki, Hotta., dan Goro Eguchi. 1997. **High-Frequency Generation of Transgenic Zebrafish which Reliably Express GFP in Whole Muscles or the Whole Body by Using Promoters of Zebrafish Origin.** Developmental Biology 192: 289-299.

Hopf, M., Goehring, W., Ries, A., Templ, R., dan Hohenester, E.2001. **Crystal Structure and Mutational Analysis of a Perlecan-Binding Fragment of Nidogen-1.** Nat. Struct. Biol. 8:634–640.

Hostetler, H.A., Peck, S.L., dan Muir, W.M .2003. **Transgenic Res.** 12: 413-424.

Houk, B. E., Gunther H., dan Jeffrey A. H.1999. **Kinetic Modeling of Plasmid DNA Degradation in Rat Plasma.** Diases dari <http://www.aapsj.org> pada tanggal 3 Januari 2011.

Hovath, L., dan L. Orban.1995. **Genome and Gene Manipulation in the Common carp.** Aquaculture 129 : 157-181.

Inoue, K., Yamashita, S., Hata, J., Kabeno, S., Asada, S., Nagahisa, E., dan Fujita, T.1990. **Electroporation as a New Technique for Producing Transgenic Fish.** Cell Differ Dev 29:123–128.

Isnaini, N. 2000. **Kualitas Seman Ayam Arab dalam Pengenceran NaCl Fisiologis dan Ringer's pada Suhu Kamar.** Habitat. Volume 11 (113):233-238

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., dan Zaneveld, L.J.D. (1986), **Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics.** J Reprod Fertil. 1984; 70: 219-228.

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

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

Kamila.2009. **Larutan Penyangga.** Diakses dari [http://kimia.upi.edu/utama/bahanajar/kuliahweb/2008/Yuti%20kamila%20\(050581\)/materi LP.html](http://kimia.upi.edu/utama/bahanajar/kuliahweb/2008/Yuti%20kamila%20(050581)/materi%20LP.html) pada tanggal 23 Desember 2010.

Khoo, H.W., Ang, L.H., Limb, H.B., dan Wong, K.Y.1992. **Sperm Cells as Vectors for Introduction Foreign DNA Into Zebrafish.** Aquaculture 107:1-19.

Khoo, H.W. 2000. Sperm-mediated gene transfer studies on zebrafish in Singapore. Mol Reprod Dev.56:278–80.

Koo, H.W., Jawahar, G.P., dan E.S Chen.1993. **Sperm-Mediated Gene Transfer: A Review**. SEAMEO-Jasper Fellowship Monograph Series 1.

Kordi, G. 1991. **Penggulungan Hama dan Penyakit Ikan**. Rineka Cipta. Jakarta.86 hal

Kurita Kayoko, Shawn M. Burgess,dan Noriyoshi Sakai.2003. **Transgenic Zebrafish Produced by retroviral infection of *in vitro*-cultured sperm**. Edited by Ryuzo Yanagimachi, University of Hawaii, Honolulu. vol. 101 (5):1263-1267

Lagler, K. 1972. **Freshwater fishery biology**. Brown Company,Iowa. 417 halaman.

Liu, Z., Moav, B., Faras, A. J., Guise, K. S., Kapuscinski, A. R., dan Hackett, P. B.1990.**Development of Expression Vectors for Transgenic fish**. Bio/technoZogy 8: 1268-1272.

Lu, J.K., Fu, B.H., Wu, J.L., dan Chen, T.T. 2002. **Production of transgenic silver sea bream (*Sparus Sarba*) by different gene transfer methods**. Mar Biotechnol 4, 328–337.

Lu, J.K., Chen, T.T., Allen, S.K., Matsubara, T., dan Burns, J.C. 1996. **Production of transgenic dwarf surf clams, *Mulinia lateralis*, with pantropic retroviral vectors**. Proc Natl Acad Sci USA 93, 3482–3486.

Lumenta, C. 2000. **Manajemen Pemberian Pakan**. Lembaga Pembinaan dan Pengembangan (LP3), Universitas Sam Ratulangi. Manado. 120 halaman.

Lyengar A., Muller, F., dan Maclean, N.1996. **Regulation and Expression of Transgenes Fish A Review**. *Transgenic Research* 5:147-166.

Maclean, N., dan Penman, D. 1990. **The Application of Gene Manipulation to Aquaculture**. Aquacultur. 85: 1-20

Makmur, safran. 2010.**Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* Val.) di Danau Moat Sulawesi Utara**.Di akses dari : www.brppu.com. Pada tanggal 6 Januari 2011.

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.

Masrizal dan Efrizal. 1997. **Pengaruh Rasio Pengenceran Mani terhadap Fertilisasi Sperma dan Daya Tetap Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L)**. Fisheries Journal Garing 6: 1-9.

Matz, M. V., Lukyanov, K. A., dan Lukyanov, S. A.2002. **Family of the Green Fluorescent protein:Journey to the end of the Rainbow**. Bioessays 24: 953–959.

Melcher,Ulrich.2000.**MolecularGenetics:Electroporation**.<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW4/MG431.html>

Morin, J. G., dan Hastings, J. W.1971. **Energy transfer in a Bioluminescent System**. J. Cell Physiol. 77:313–318.

Moyer, L.S.1936. **A Suggested Standard Method for the Investigation of Electrophoresis**,J Bacteriology, 31(5):531-546.

Muller, F., Ivies, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvath, L., Maclean, N., dan Orban L. 1992.**Introducing Foreign Genes into Fish Eggs by Electroporated Sperm as a Carrier**. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1: 276-281.

Mukhlas.2009. **Hipofisa dan Ovaprim**. Diakses dari <http://mukhlasmuthiullah.blogspot.com/2009/03/hipofisa-dan-ovaprim.html> pada tanggal 17 Desember 2010.

Nakamura, Harukazu. 2009. **Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology**. Springer. 300 halaman.

Nurman. 1998. **Pengaruh penyuntikan Ovaprim terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus Burchell*)**. Fisheries Journal Garing 7: 34-42

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofscneider, P.H .1982. **Gene Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric Fields**. EMBO J 1: 841–5.

Noh, J.K., Cho, K.N., Han, E.H., Kim, A., Lee, J.S., Kim, D.S., dan Kim, C.G.2003. **Genomic Cloning of Mud Loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) Beta-actin Gene and Usefulness of its Promoter Region for Fish Transgenesis**. Marine Biotechnology 5 (3): 244-252.

Nugrahani, W. 2008. **Isolasi Promoter β -Actin Ikan Kerapu Bebek *Cromileptes altivelis* dengan Metode Degenerate PCR**. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.

Nakamura, Harukazu. 2009. **Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology**. Springer. 300 halaman.

Oko, R.J., dan Kazemie, M.1998. **The Biochemistry of The Sperm Inner Acrosomal Membrane and Its R3elevance to fertilization**. Proc 20 th. Annual Work Shop Canada West Society reprod boil 1998; abstr 9.

Ozato,K.,Kondoh, H., Inohara,H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y., dan Okada T.S.1986. **Production of Transgenic Fish: Introduction and Expression of Chicken d-Crystallin Gene in Medaka Embryos**.Cell Differ 19:234-237.

Oyen, F.G.F., L.F.C.M.M. Camps, dan E.S.W. Bongo. 1991. **Effect on acid stress on embrionic development of common carp (*Cyprinus carpio*)**. Aquaculture, 19: 1-12

Paisal. 2008. **Pemeriksaan Sperma**. Diakses dari : <http://www.wartamedika.com>

Pescod, M.B. 1973. **Investigati on of Rational Effluent Stream Standards for Tropical Countries**. AIT. Bangkok.428 halaman.

Prasher, D.C., M. Chalfie., Y.Tu., G. Euskirchen, dan W.W. Ward. 1995. **Green Fluorescent Protein as a marker for Gene Expression**. Science 263 : 802 – 805

Purwanti, L.I. 2007. **Uji Efektifitas Promoter β -actin Ikan Medaka (*Oryzias latipes*) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)**. Skripsi Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor

Partodihardjo, S.1987. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. 558 halaman

Potter, H., Weir, L., Leder, P.1984. **Enhancer-dependent Expression of Human κ 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., dan Dunham, R.A.1992. **Electroporation: a Method for Transferring Genes into Gametes of Zebrafish (*Brachydanioreio*), Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) and Common carp (*Cyprinus carpio*)**. Mol Mar Biol Biotechnol 1: 301–308.

_____, Kirby, V.L., Cole, T., dan Hereford, L .1995. **Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos**. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 4: 369-376.

Purves, W.K.2001. **Life: The Science of Biology- 6th ed**. Sinauer Associates. Halaman 316-317.

Ravensong.2001. **Chemical Composition of Sperm**. Diakses dari <http://everything2.com/title/chemical%2520composition%2520of%2520sperm> pada tanggal 2 November 2010.

Revay, T., S. Nagy, A. Kovacs, M.E. Edvi, A. Hidas, W. Rens, dan I. Gustavsson. 2004. **Head Area Measurements of Dead, Live, X- and Y- Bearing Bovine Spermatozoa**. Reproduction, Fertility and Development 16(7): 681-687

Richter, C.J.J, dan Rustidja, 1985. **Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan**. Fisheries Project Nuffle Universitas Brawijaya Malang. Halaman 1-74.

Robertis, E.D., dan Robertis, E.M. 1979. **Cell and Moleculer Biology**. Philadelphia: Saydesr College. 8:70-74

Rols, M.P., dan Justin T. 1998. **Electropermeabilization of Mammalian Cells to Macromolecules : Control by Pulse Duration**. Biophysical Journal Volume 75 setpember 1998 1415-1423

Rustidja.2000. **Prospek Pembekuan Sperma Ikan**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Halaman 4-16.

_____.2002. **Diktat Kuliah Breeding dan Reproduksi Hewan Air**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Halamn 4-16.

_____.1985. **Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan**. Fisheries Project Unibraw. Malang.67 halaman.

Saanin, H.1968. **Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan Cetakan I**. Bina Cipta, Jakarta. 40 halaman.

Sambrook, J., dan Russell, D.W. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold SpringHarbor, NY, USA. 2001;3(16):16.1-16.62.

Samarfilk, Aliye.2002. **Application of Gene Transfer Technology for Genetic Improvement of fish**. University of Çanakkale Onsekiz Mart, Aquaculture College, 17100. 9 halaman.

Santoso, S. 2001. **Buku Latihan SPSS Statistik Non Parametrik**. Alex Media Komputindo kelompok Gramedia.Jakarta. 64 Halaman

Samasik, A., Warr, G., dan Chen, T.T. 2002. **Production of transgenic fish with elevated levels of innate defense activity to bacterial pathogens**. Marine Biotechnol 4:310–322.

Santoso, B.1993. **Seri Budidaya Ikan Mas**. Penerbit kanisius. Yogyakarta. Halaman 14-17.

Sastrosupadi, A.2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian**. Kanisius. Jogjakarta.

Shimogori, T., dan Ogawa, M. 2008. **Gene Aplication with in Utero Electroporation in Mouse Embryonic Brain**. Dev Growth Differ 50: 499-506

Silveira, A. N., Fausto, F., Rosicleire V. S, dan José, A. S.2006. **Seminal Analysis, Cyrogenic Preservation, and Fertility in Matrinxá Fish, Bryconcephalus(Gunther, 1869)**.Diaksesdari<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=s15168913200600050015&lng=en&nrm=iso&tling=en>.

Sin, F.Y., Walker, S.P., Symonds, J.E., Mukherjee, U.K., Khoo, J.G., dan 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

_____, walker, S.P., Symonds J.E, dan Sin I.L. 2008. **Sperm Mediated Gene Transfer In Chinook Salmon**. <http://www.heb.pac.dfompo.gc.ca>

_____, Bartley, A.L., Walker,S.P., Sin, I.L., Symonds,J.E., Hawke,L., dan Hopkins,C.L. 1993. **Gene Transfer in Chinook Salmon (Oncorhynchus tshawytscha) by Electroporating Sperm in the Presence of pRSV-lacZ DNA**. Aquaculture 117:57-69

Shigekawa, K., dan Dower, W.J.1988. **Electroporation of Eukaryotes and Prokaryotes: a General Approach to Introduction of Macromolecules into Cells**. *Biotechniques* 6: 742–751.

Shimomura, O., Johnson, F. H., dan Saiga, Y.1962. **Extraction, purification, and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea**. *J. Cell Comp. Physiol.* 59:223–239.

Silviera, A. N., Fausto, F., Rosicleire, V. S., dan Jose, A. S.2006. **Seminal Analys, Cryogenic Preservation, and Fertility In Matrinxã Fish, Brycon cephalus(Gunter,1986)**. Diakses dari <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciartext&pid=S1516-89132006000500015&lng=en&nrm=iso&tlg=en>. Diakses pada tanggal 23 November 2010.

Sistina, Yulia. 2000. **Biologi Reproduksi**. Fakultas Biologi Unsoed, Purwokerto. 24 halaman.

Soelistyowati. 2003. **Diktat Kuliah Rancangan Percobaan Penelitian**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 4-5.

Soeminto.1993. **Dasar-dasar Embriologi**. Fakultas Biologi Unsoed, Purwokerto.

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

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

Soetomboz. 2008. **Percobaan Faktorial, Sebuah Pengantar**. Diakses dari http://analistat.com/readarticle.php?article_id=23 pada tanggal 4 Januari 2011.

Soleha. 2010. **Pengaruh Lama dan Jumlah Kejutan Listrik yang Berbeda Terhadap Motilitas, Mortalitas dan Daya Fertilitas sperma Ikan Nilem (Osteochilus hasselti)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. UB.Malang. 102 Halaman

Squires, E.J.1998. **Status of Sperm-Mediated of Delivery Method for Gene Transfer**. A.B.I Publishing. University Press. Cambridge New York.

Stoss, J. 1983. **Fish Gamete Preservation and Spermatozoan Physiology**. In : Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. *Fish Physiology*. New york, NY : Academy Press Volume IXB: 305-350

Sumantadinata, K. 1983. **Aplikasi Bioteknologi dalam Pembenihan Ikan**. *Buletin Perikanan*. Vol. IV (1) : 28-41.

_____.1981. **Perkembangbiakan Ikan – Ikan Peliharaan Indonesia**. Fakultas Perikanan, Bogor.

Susanto. H. 2005. **Info Perikanan Budidaya Ikan Nilem**. Di akses dari: www.Blogdetik.com pada tanggal 6 januari 2011.

_____. 2006. **Budidaya Ikan di Pekarangan edisi Revisi**. Penebar Swadaya. Jakarta.

Syahid, A. 2009. **Rancangan Acak Lengkap**. Diakses dari <http://abdulsyahid-forum.blogspot.com/2011/01/Rancangan-acak-lengkap-ral.html> pada tanggal 23 januari 2011.

Symonds, J.E., Walker, S.P., dan Sin, F.Y.T. 1994. **Electroporation of Salmon Sperm with Plasmid DNA: Evidence of enhanced sperm/ DNA association**. *Aquaculture* 119:313-327

Takagi, S., Sasado, G., Tamiya, G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A., dan Kimura, M.1994. **An efficient expression vector for transgenic Medaka construction**. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:192-199.

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.

Teissie', J., dan C. Ramos. 1998. **Correlation Between Electric Field Pulse Induced Long-Lived Permeabilization and Fusogenicity in Cell Membranes**. *Biophysical Journal* April 1998 74: 1889–1898

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

_____. 1981. **Inseminasi buatan pada Ternak Angkasa, Bandung**. Halaman 1-122.

Tortora, Gerard J.2001. **Microbiology: An Introduction**. USA: Addison Wesley Longman Inc.

Tsai, H.J.2000. **Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish**. *Molecular Reproduction and Development* 56: 281-284.

Tseng, F.S., Lio, I.C., dan Tsai, H.J.1994. **Introducing the exogenous growth hormone cDNA into loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) eggs via electroporated sperm as carrier**. In "3rd International Marine Biotechnology Conference, Tromso, Norway" abstract pp. 71.

Volckaert, F.A., Hellemans, B.A., Galbusera, P., dan Ollevier, F.1994. **Replication, expression and fate of foreign DNA during embryonic and larval development of the African Catfish *Clarias gariepinus***. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(2):57-69.

Ward, W.W., dan Cornier, M.J.1979. **An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence: Characterization of the Renilla green-fluorescent protein**. *J. Biol Chem.* 254:781–788.

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

_____. 1995. **Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms.** In: **Nickoloff JA, editor. Electroporation Protocols for Microorganisms.** Totowa, New Jersey: Humana Press. Halaman 1-26.

_____. 1993. **Electroporation: a General Phenomenon For Manipulating Cells and Tissue.** J. Cell. Biochem. 51:426-435

Weitze, K.F., dan Petzoldt, R. 1992. **Preservation of Semen.** Amin Reprod Sci 28:229-235

Wira. 2007. **Tingkah Laku Pemijahan Biota Akuatik (part 2).** Diakses dari <http://maswira.blogspot.com> pada tanggal 25 Desember 2010.

Wongso, Anton Darsono.2007. **Membaca Analisis Sperma.** [http:// klinikandrologi.blogspot.com](http://klinikandrologi.blogspot.com).diakses tanggal 17 november 2010.

Woynarovich, E dan L. Horvath .1980. **The Artificial Propagation of Warm Water Fin fish- A manual Of Extension.** FAO. Fhiseries Technical Paper. Rome. 201: 1- 183

Wu, Y.L., Pan, X., Sudha, P.M., Wang, H., Kee, P.W., dan Gong, Z.2007. **Developmental of a *heatshock* inducible GFP transgenic Zebrafish line by using the Zebrafish hsp27 promoter.** 408: 85-94.

Yazawa, R., Hirono, I., dan Aoki, T.2005. **Characterization of promoter activities of four different Japanese Flounder promoters in transgenic Zebrafish.** Marine Biotechnology 7: 625-633.

Yitnosumarto, Suntoyo.1993. **Percobaan Perancangan, Analisis dan Interpretasinya.** Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Halaman 124-166.

Yu, I., dan S.P. Leibo, S.P. 2002. **Recovery Motile, Membrane Intact Spermatozoa From Canine Epididymides Stored for 8 Days at 4°C.** Theriogenology 57 (3): 1179-1190

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

Zaneveld, L.J.D.1978. **The Biology of Human Spermatozoa.** Dalam Wynn ED. Obstetric and Gynecology Annual. Appleton Century Croft. Chicago.page :15 – 40.

Zhanggischan, Zuhail. E.E.2004. **Prinsip Dasar Elektroteknik.** Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. 748 halaman.

Zhu, Z., Li, G., He, L., dan Chen, S. 1985. **Novel gene transfer into the fertilised eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758)**. *Journal of Applied Ichthyology* 1: 31-34.



LAMPIRAN

Lampiran 1: Alat dan Bahan

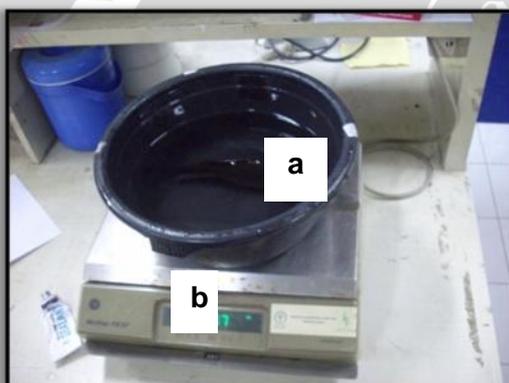
❖ Peralatan Penyutikan Induk



Sprit



a. Penggaris Kayu
b. Ikan Sampel



a. Ember
b. Timbangan Digital "Mettler PE 22"



Ovaprim



Alkohol 70%



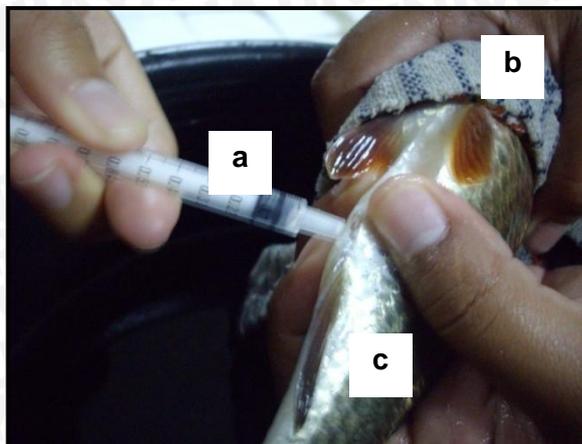
Tissue



NaFis

Lampiran 1 (Lanjutan)

- ❖ Stripping Induk Jantan dan Induk Betina
- Induk jantan

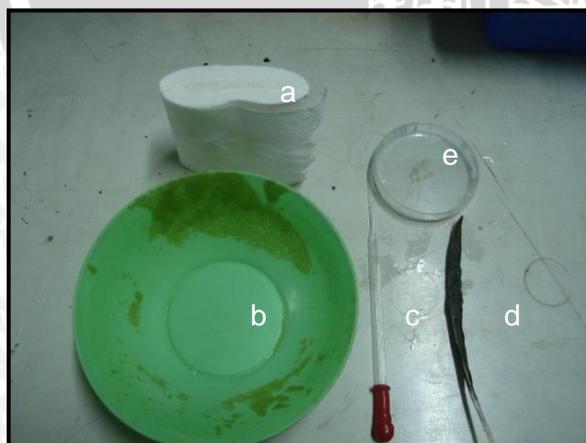


- a. Spuit 10 ml
- b. Serbet
- c. Ikan Nilem

- Induk Betina



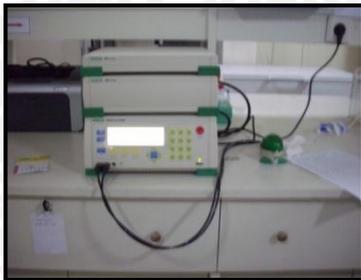
Timbangan Digital



- a. Tissue
- b. Baskom
- c. Pipet Tetes
- d. Bulu Ayam
- e. Petri Disc

Lampiran 1 (Lanjutan)

❖ **Perlakuan Elektroporasi**



Alkohol 70%



Mikro Pipet



Cuvette



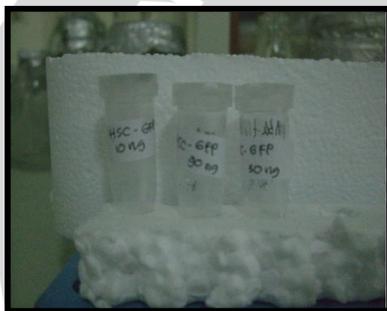
Yellow Tip



Apendorf



Blue Tip



Hr GFP



Hair Dryer

❖ **Pengamatan Motilitas dan Viabilitas Sperma Ikan Nilem**



Mikroskop inverted



**a. Cover Glass
b. Cover Clip**



Eosin

Lampiran 1 (Lanjutan)

❖ Pengamatan Integrasi GFP



Confocal Laser Scanning Microscopy

❖ Perhitungan Konsentrasi Sperma



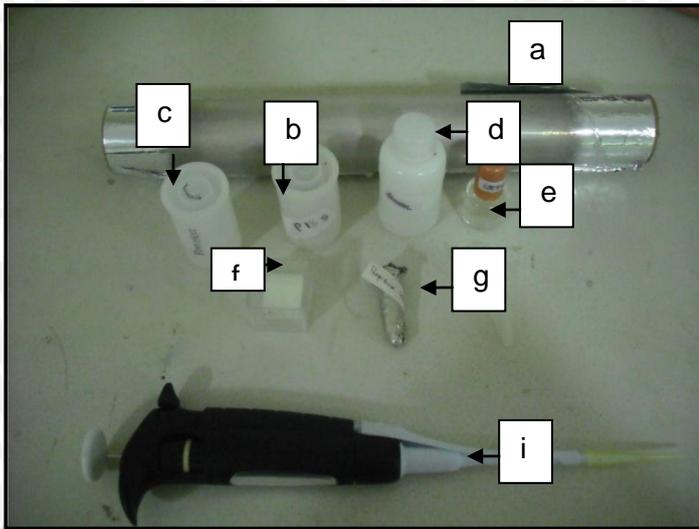
Haemocytometer



Handtally Counter

Lampiran 1 (Lanjutan)

❖ Pewarnaan Propidium Iodide



- a. Aluminium Foil
- b. Larutan PBS
- c. Formalin
- d. Gliserol
- e. Cat kuku
- f. Cover Slip Ukuran 20x20
- g. Propidium Iodide
- h. Appendorf
- i. Mikropipet

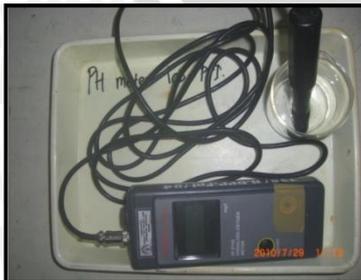
❖ Pemeliharaan Telur dan Larva



Media Penetasan Telur



Mikroskop



pH dan DO Meter



Heater



Termometer

Lampiran 2: Uji Normalitas dan Analisa Data Motilitas (%) Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

- Uji Normalitas Perlakuan Elektroporasi pada Ikan Nilem (*Osteochillus hasselti*)

		Motilitas	Viabilitas	Fertilitas	HR	Ekspresi GFP	Lama Kejutatan	Jumlah Kejutatan
N		12	12	12	12	12	12	12
Normal Parameters ^a	Mean	69.17	44.0217	38.1208	22.2192	28.4817	1.50	2.00
	Std. Deviation	13.114	1.71005E1	1.21563E1	9.76630	22.78647	.522	.853
Most Extreme Differences	Absolute	.212	.217	.201	.161	.170	.331	.213
	Positive	.174	.217	.136	.161	.170	.331	.213
	Negative	-.212	-.101	-.201	-.128	-.148	-.331	-.213
Kolmogorov-Smirnov Z		.735	.751	.696	.557	.587	1.146	.737
Asymp. Sig. (2-tailed)		.652	.626	.718	.916	.881	.145	.648

- ❖ Dari analisa data uji normalitas didapatkan hasil sebaran normal pada semua perlakuan
- ❖ Tabel Motilitas Ikan Nilem (*Osteochillus hasselti*)

Perlakuan	Lama Kejutatan	Jumlah Kejutatan	Ulangan		Total	Rata2
			1	2		
	Pulse Length	Pulse Number				
A1		B1	80	70	150	75
		B2	60	50	110	55
		B3	60	50	110	55
A2		B1	80	90	170	85
		B2	80	70	150	75
		B3	80	60	140	70
Total			-	-	830	-

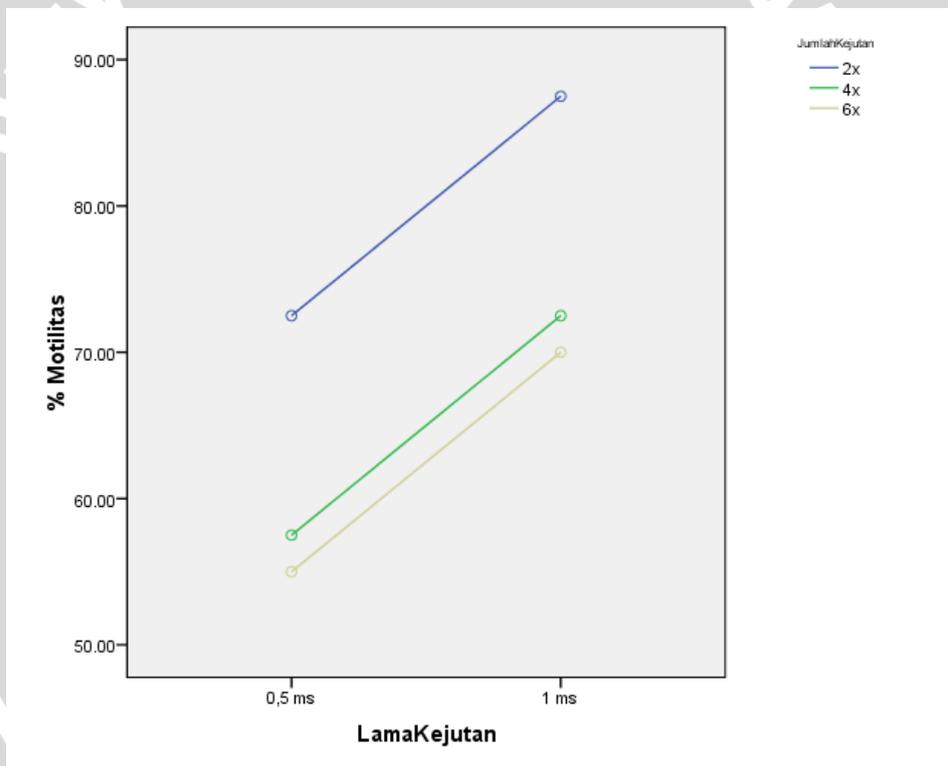
Lampiran 2 (Lanjutan)

Analisa Sidik Ragam Motilitas

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Corrected Model	1391.667 ^a	3	463.889	7.422	.011
Intercept	57408.333	1	57408.333	918.533	.000
LamaKejutan	675.000	1	675.000	10.800	.011
jumlahKejutan	716.667	2	358.333	5.733	.029
Error	500.000	8	62.500		
Total	59300.000	12			
Corrected Total	1891.667	11			

a. R Squared = ,736 (Adjusted R Squared = ,637)

Grafik Motilitas



Lampiran 3: Analisa Data Viabilitas (%) Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)(%)

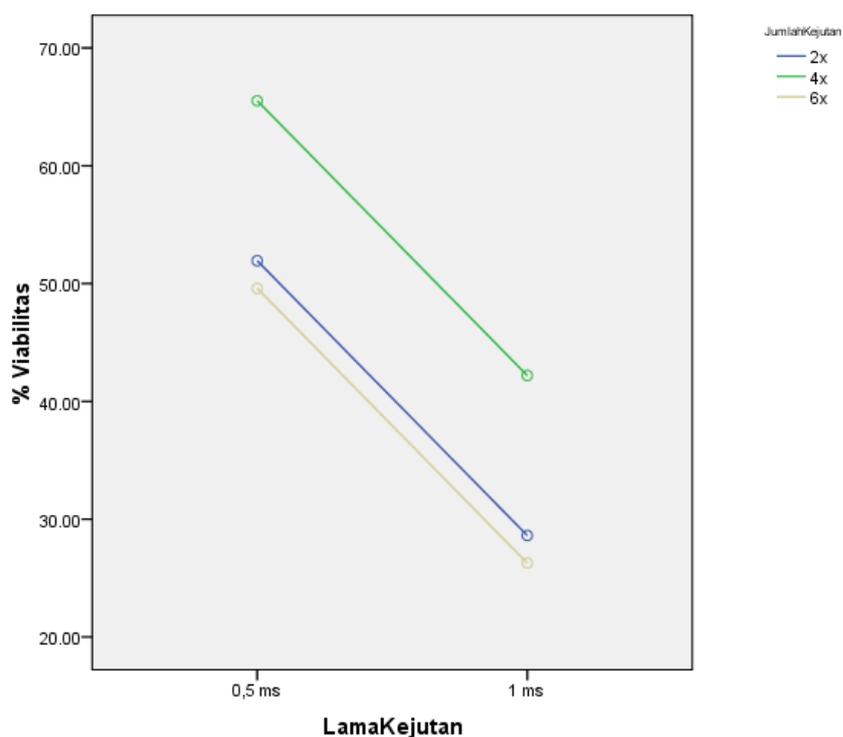
Perlakuan		Ulangan		Total	Rata2
Lama Kejutatan	Jumlah Kejutatan	1	2		
Pulse Length	Pulse Number				
A1	B1	24,71	55,73	80,44	40,22
	B2	31,81	38,18	69,99	34,99
	B3	58,04	57,23	115,27	57,63
A2	B1	80,51	77,77	158,28	79,14
	B2	54,54	60,00	114,54	57,27
	B3	69,81	63,15	132,96	66,48
Total		-	-	671,48	-

Analisa Sidik Ragam Viabilitas

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Corrected Model	2222.904 ^a	3	740.968	5.965	.019
Intercept	23254.886	1	23254.886	187.203	.000
LamaKejutatan	1631.467	1	1631.467	13.133	.007
jumlahKejutatan	591.436	2	295.718	2.381	.154
Error	993.783	8	124.223		
Total	26471.572	12			
Corrected Total	3216.686	11			

a. R Squared = ,691 (Adjusted R Squared = ,575)

Grafik Viabilitas



Lampiran 4: Daya Fertilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)(%)

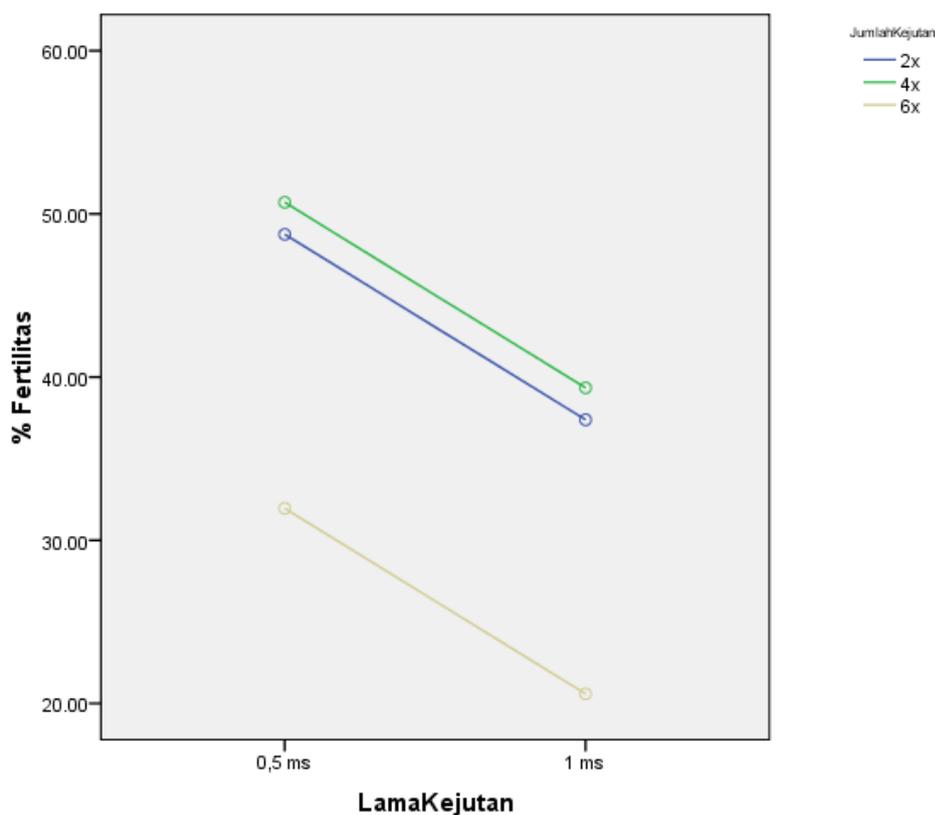
Perlakuan		Ulangan		Total	Rata2
Lama Kejutatan	Jumlah Kejutatan	1	2		
Pulse Length	Pulse Number				
A1	B1	48,50	44,53	93,03	46,51
	B2	46,97	53,90	100,87	50,43
	B3	45,45	23,48	68,93	34,46
A2	B1	38,12	41,12	79,24	39,62
	B2	45,00	34,23	79,23	39,61
	B3	19,84	16,31	36,15	18,07
Total		-	-	457,45	-

Analisa Sidik Ragam Fertilitas

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Corrected Model	1238.034 ^a	3	412.678	8.520	.007
Intercept	17438.375	1	17438.375	360.029	.000
LamaKejutatan	387.717	1	387.717	8.005	.022
jumlahKejutatan	850.317	2	425.159	8.778	.010
Error	387.489	8	48.436		
Total	19063.898	12			
Corrected Total	1625.523	11			

a. R Squared = ,762 (Adjusted R Squared = ,672)

Grafik Daya Fertilitas



Lampiran 5: Daya tetas Telur Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) (%)

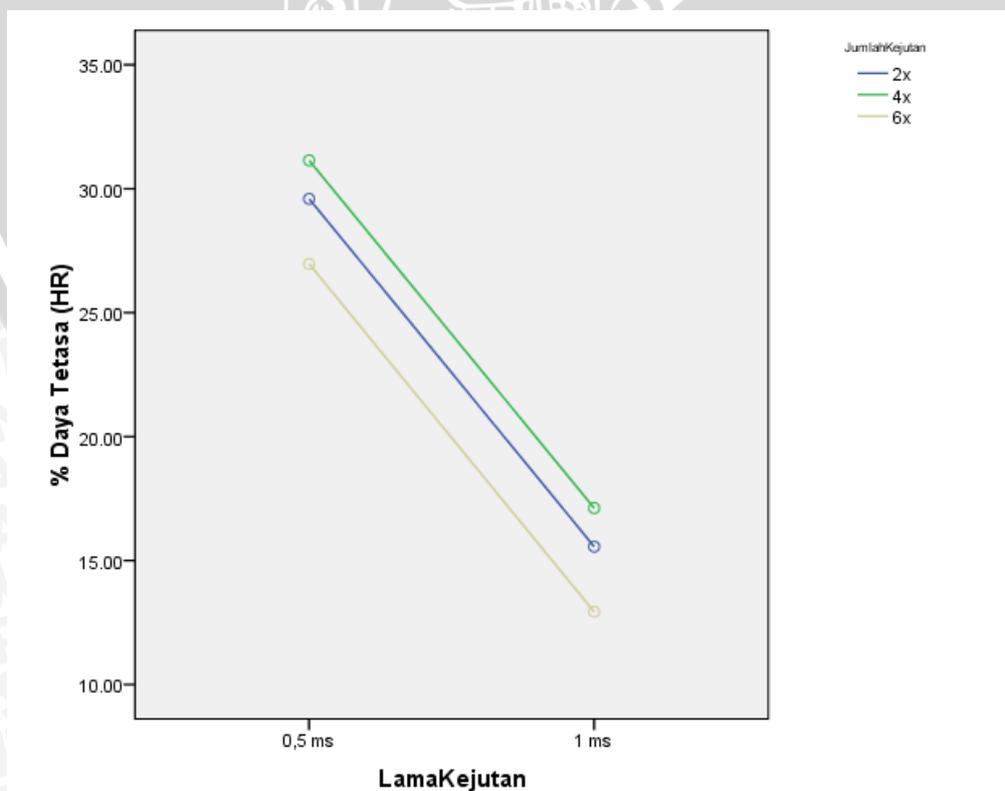
Perlakuan		Ulangan		Total	Rata2
Lama Kejutatan	Jumlah Kejutatan	1	2		
Pulse Length	Pulse Number				
A1	B1	32,30	28,82	61,12	30,56
	B2	22,85	36,23	59,08	29,54
	B3	38,18	17,12	55,30	27,65
A2	B1	11,11	18,18	29,29	14,64
	B2	24,44	13,15	37,59	18,79
	B3	12,00	12,50	24,50	12,25
Total		-	-	266,88	-

Analisa Sdik Ragam HR (Daya Tetas)

Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Corrected Model	626.098 ^a	3	208.699	3.946	.053
Intercept	5924.296	1	5924.296	112.020	.000
LamaKejutatan	590.382	1	590.382	11.163	.010
jumlahKejutatan	35.715	2	17.858	.338	.723
Error	423.089	8	52.886		
Total	6973.483	12			
Corrected Total	1049.186	11			

a. R Squared = ,597 (Adjusted R Squared = ,446)

Grafik HR (Daya Tetas)



Lampiran 6: Ekspresi Gen GFP pada Inti Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) (100%)

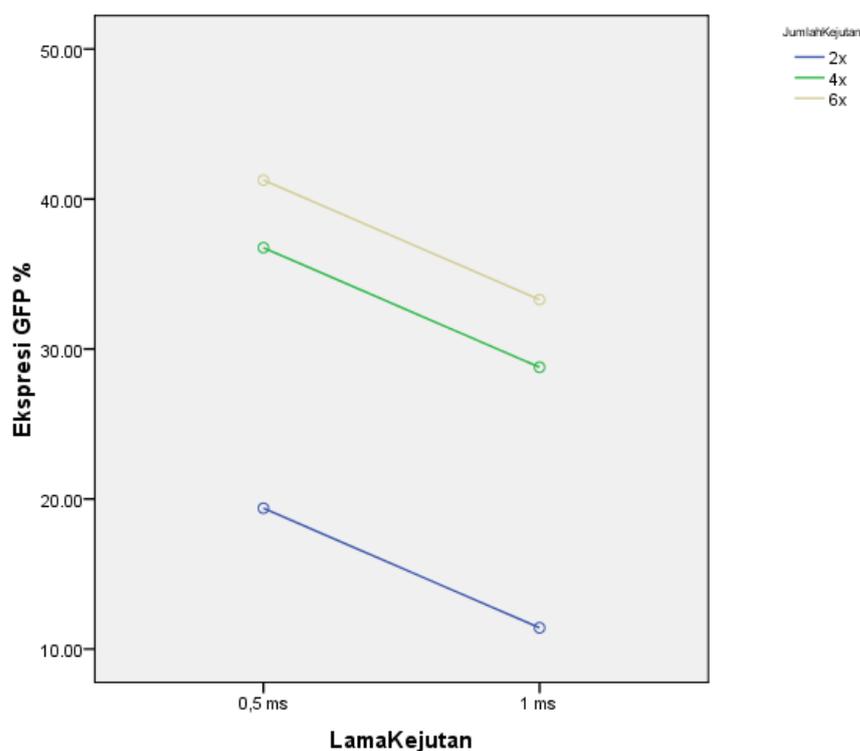
Perlakuan		Ulangan		Total	Rata2
Lama Kejutkan	Jumlah Kejutkan	1	2		
Pulse Length	Pulse Number				
A1	B1	0	22,22	22,22	11,11
	B2	42,55	23,52	66,07	33,03
	B3	46,51	60	106,51	53,25
A2	B1	22,00	17,39	39,39	19,69
	B2	0	65	65	32,5
	B3	0	42,59	42,59	21,29
Total		-	-	341,78	-

Analisa Sidik Ragam Ekspresi GFP

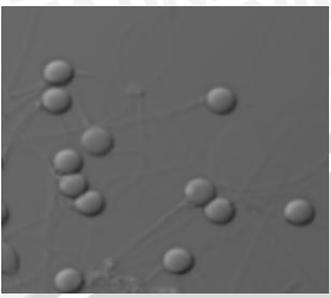
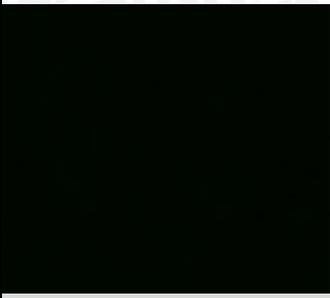
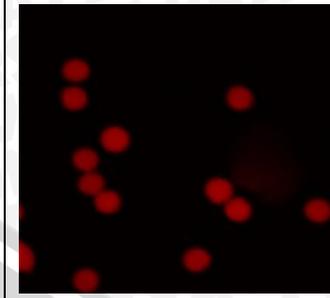
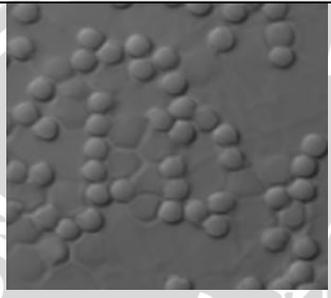
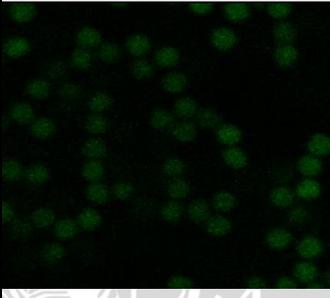
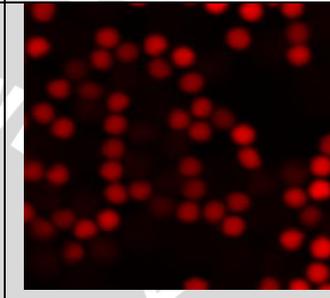
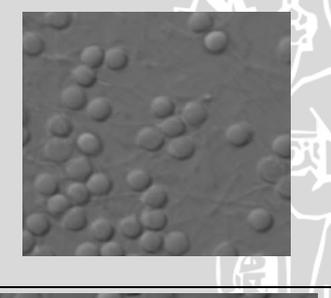
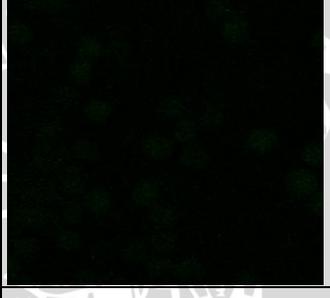
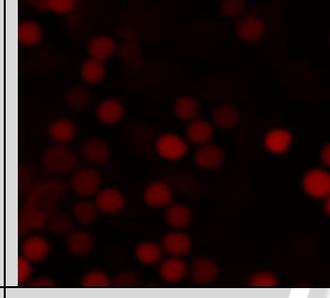
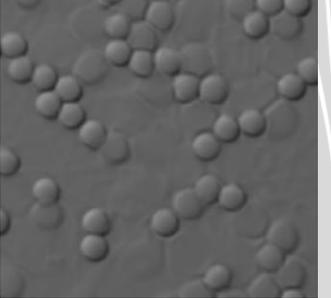
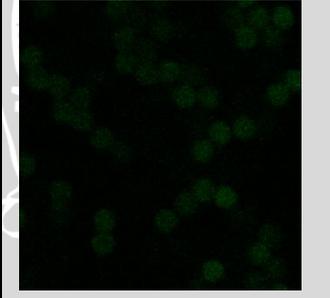
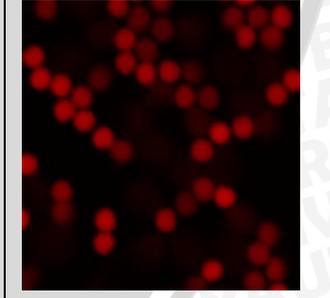
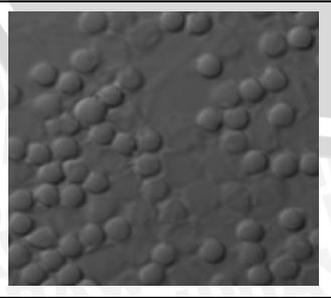
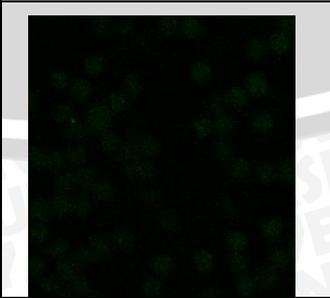
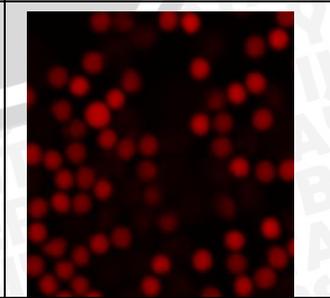
Sumber Keragaman	JK	df	KT	F	Sig.
Corrected Model	1257.585 ^a	3	419.195	.753	.551
Intercept	9734.464	1	9734.464	17.485	.003
LamaKejutkan	190.563	1	190.563	.342	.575
jumlahKejutkan	1067.023	2	533.511	.958	.424
Error	4453.872	8	556.734		
Total	15445.922	12			
Corrected Total	5711.458	11			

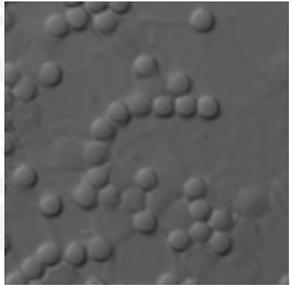
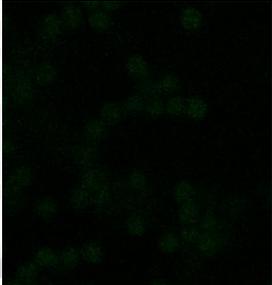
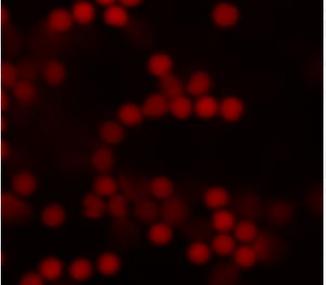
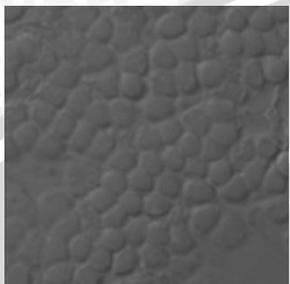
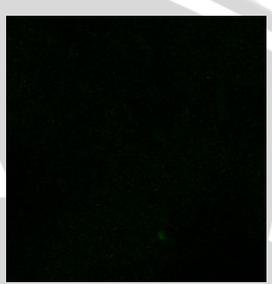
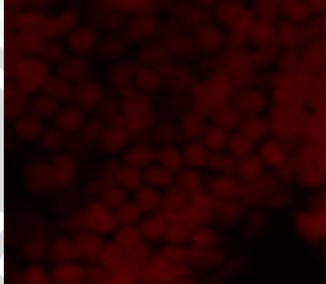
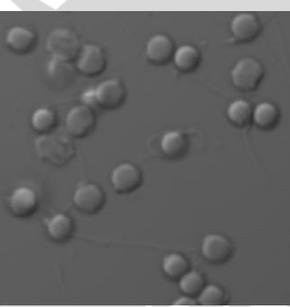
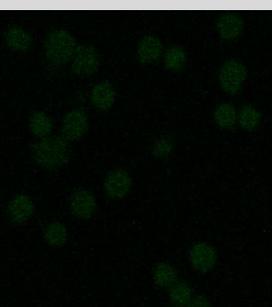
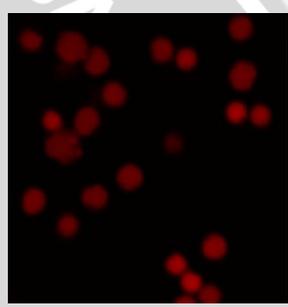
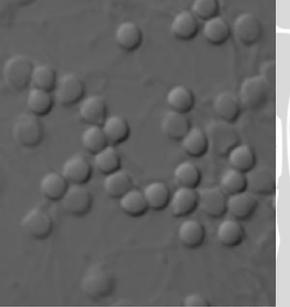
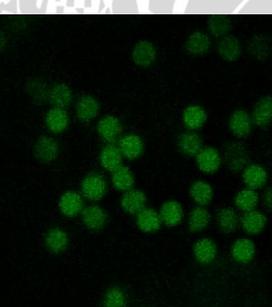
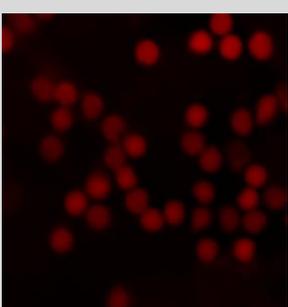
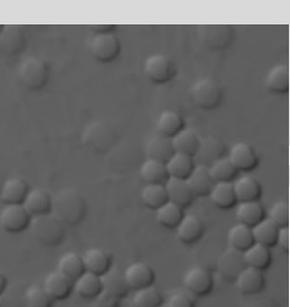
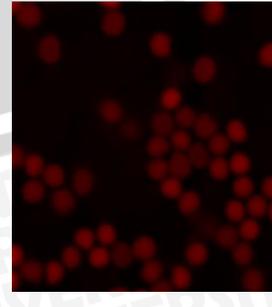
a. R Squared = ,220 (Adjusted R Squared = -,072)

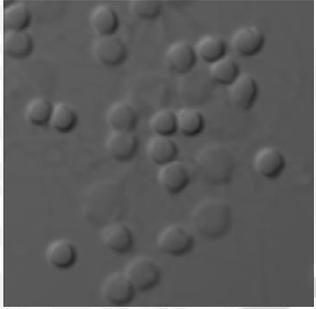
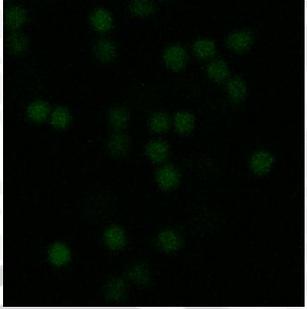
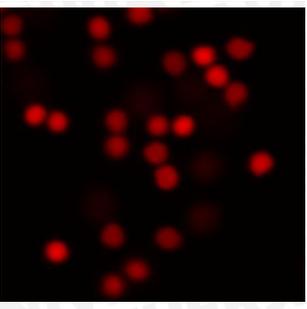
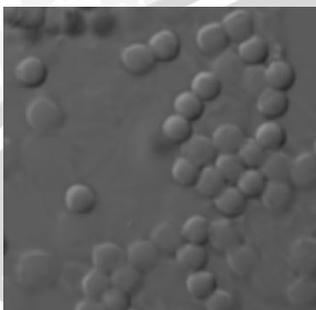
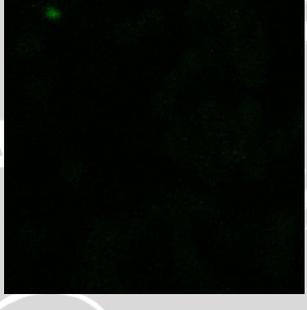
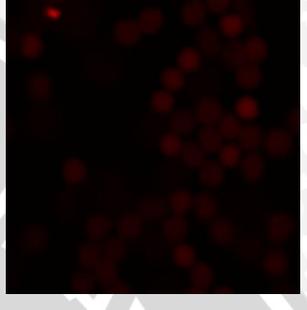
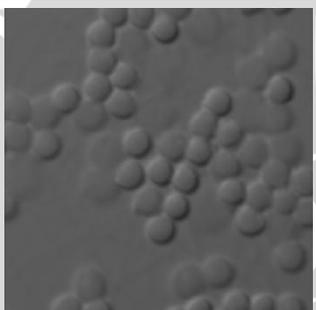
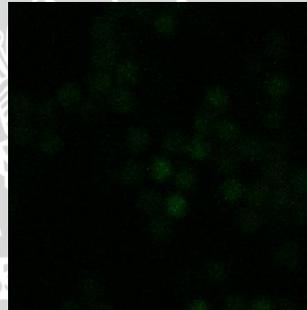
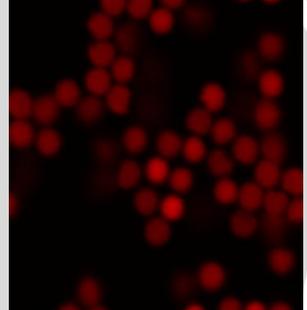
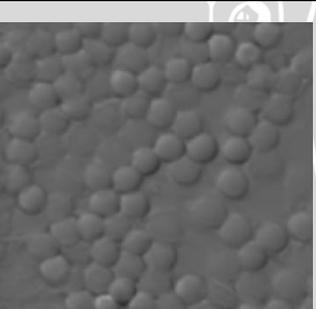
Grafik Ekspresi GFP



Lampiran 7. Hasil Pengamatan Fluoresensi Sperma dengan Mikroskop Konfokal (perbesaran 2400x)

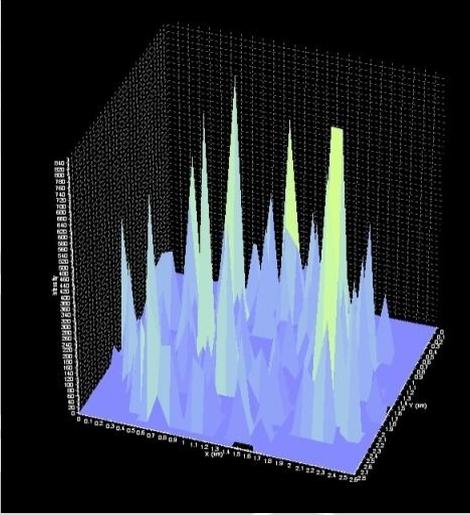
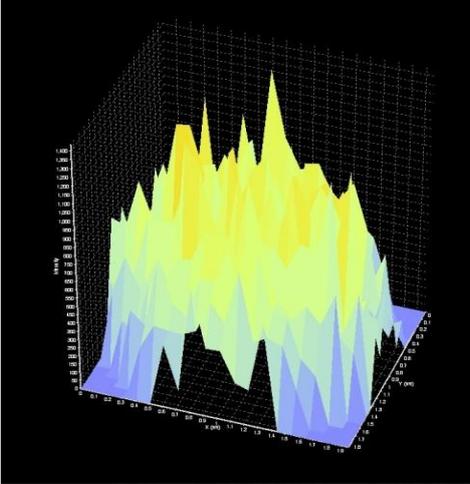
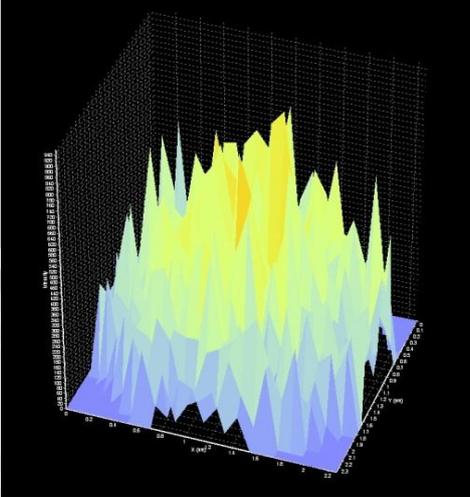
No	Perlakuan	DIC	GFP	PI
1	Kontrol I			
2	0,5 ms 2x ulangan 1			
3	0,5 ms 2x ulangan 2			
4	0,5 ms 4x ulangan 1			
5	0,5 ms 4x ulangan 2			

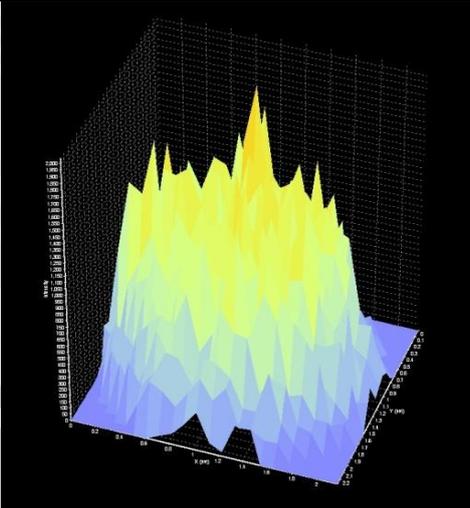
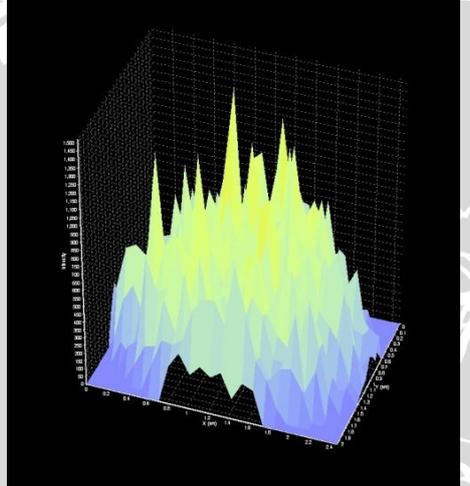
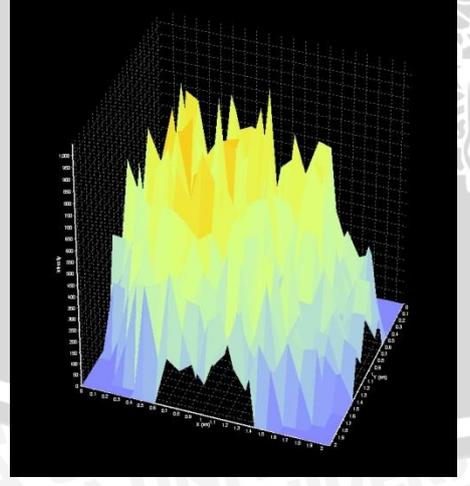
6	0,5 ms 6x ulangan 1			
7	0,5 ms 6x ulangan 2			
8	1 ms 2x ulangan 1			
9	1 ms 2x ulangan 2			
10	1 ms 4x ulangan 1			

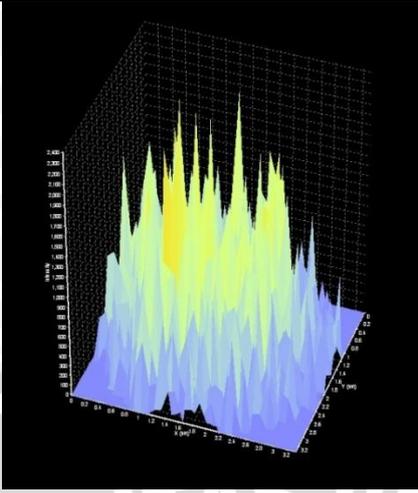
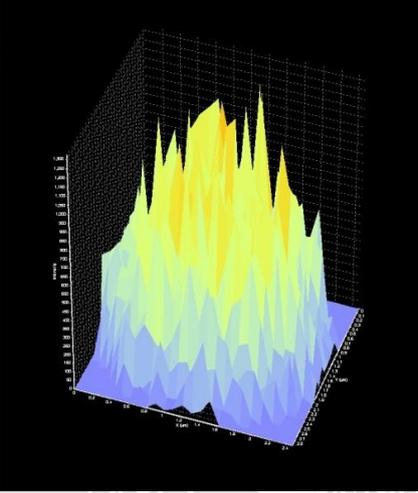
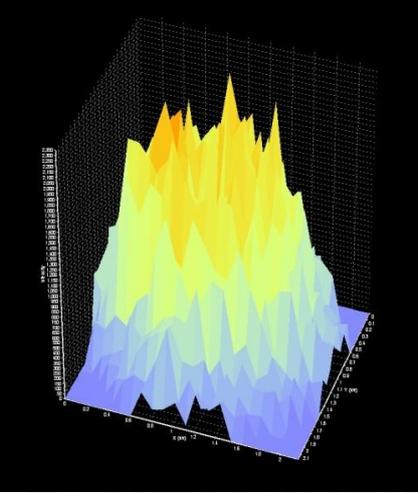
11	1 ms 4x ulangan 2			
12	1 ms 6x ulangan 1			
13	1 ms 6x ulangan 2			
14	Kontrol II			

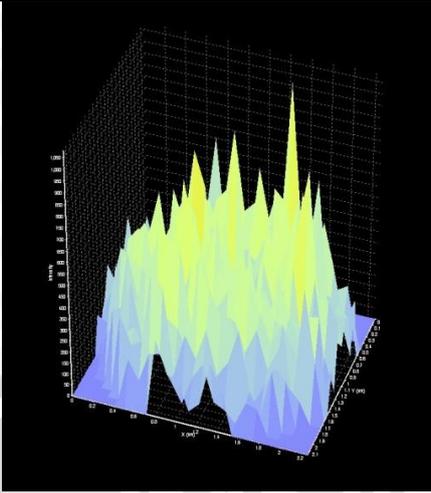
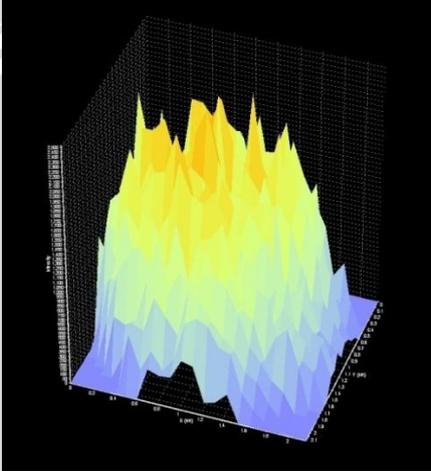
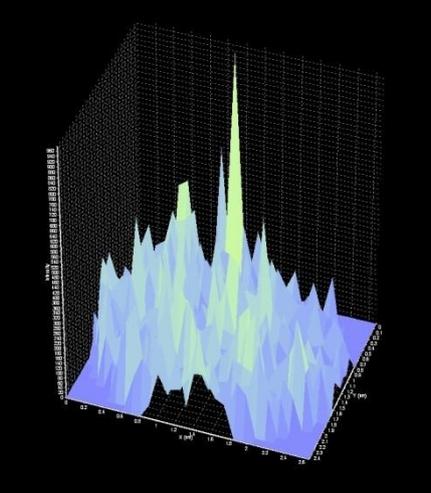


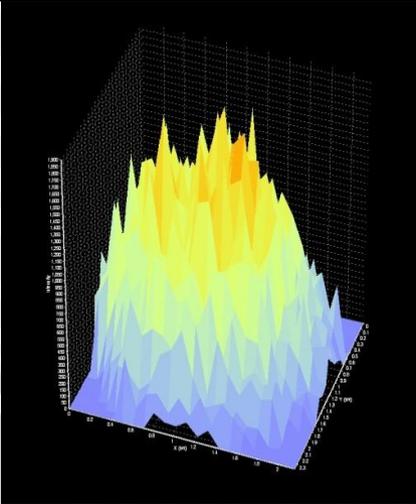
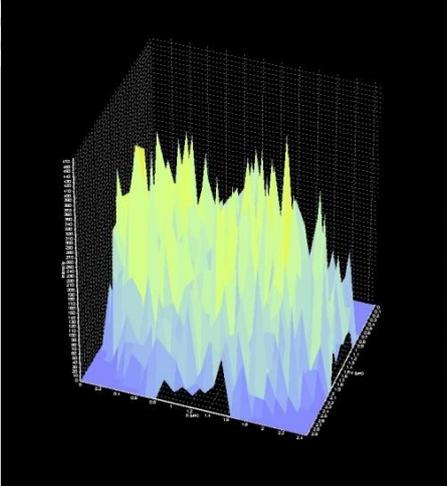
Lampiran 8. Analisa Intensitas Pendaran GFP pada Sperma

No	Perlakuan	Grafik intensitas	Nilai Intensitas Tertinggi
1	Kontrol I	 <p>A 3D surface plot showing GFP intensity. The vertical axis is labeled 'intensity' and ranges from 0 to 500. The horizontal axes are labeled 'x (µm)' and 'y (µm)'. The plot shows several sharp, narrow peaks of varying heights, with the highest peak reaching approximately 500. The surface is colored with a gradient from blue at the base to yellow at the peaks.</p>	500
2	0,5 ms 2x ulangan 1	 <p>A 3D surface plot showing GFP intensity. The vertical axis is labeled 'intensity' and ranges from 0 to 1250. The horizontal axes are labeled 'x (µm)' and 'y (µm)'. The plot shows a dense field of peaks, with many reaching heights between 1000 and 1250. The surface is colored with a gradient from blue at the base to yellow at the peaks.</p>	1250
3	0,5 ms 2x ulangan 2	 <p>A 3D surface plot showing GFP intensity. The vertical axis is labeled 'intensity' and ranges from 0 to 650. The horizontal axes are labeled 'x (µm)' and 'y (µm)'. The plot shows a dense field of peaks, with many reaching heights between 500 and 650. The surface is colored with a gradient from blue at the base to yellow at the peaks.</p>	650

<p>4</p>	<p>0,5 ms 4x ulangan 1</p>		<p>1650</p>
<p>5</p>	<p>0,5 ms 4x ulangan 2</p>		<p>1250</p>
<p>6</p>	<p>0,5 ms 6x ulangan 1</p>		<p>750</p>

<p>7</p>	<p>0,5 ms 6x ulangan 2</p>		<p>1900</p>
<p>8</p>	<p>1 ms 2x ulangan 1</p>		<p>1000</p>
<p>9</p>	<p>1 ms 2x ulangan 2</p>		<p>2050</p>

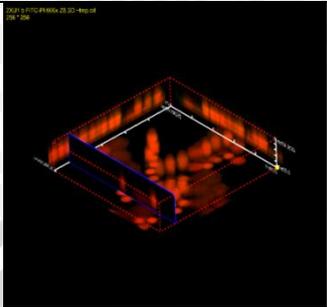
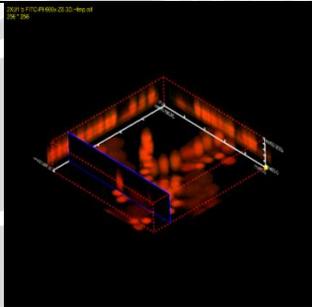
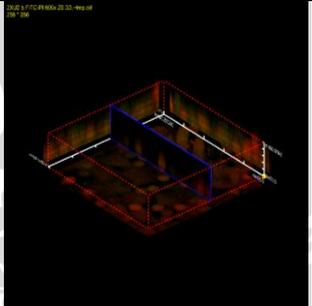
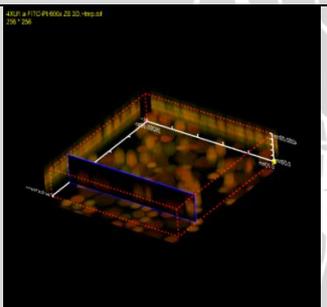
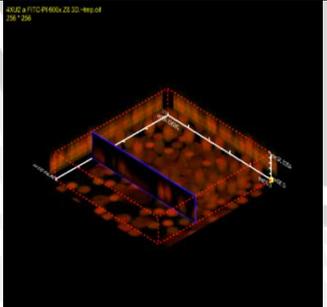
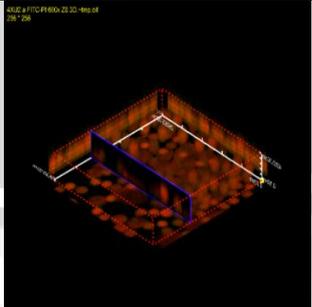
<p>10</p>	<p>1 ms 4x ulangan 1</p>		<p>975</p>
<p>11</p>	<p>1 ms 4x ulangan 2</p>		<p>1850</p>
<p>12</p>	<p>1 ms 6x ulangan 1</p>		<p>940</p>

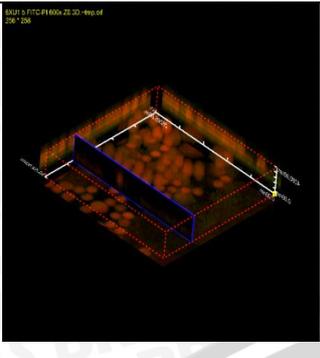
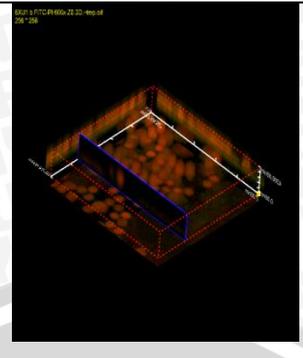
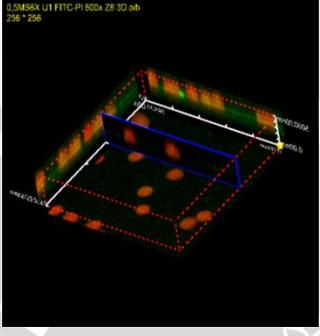
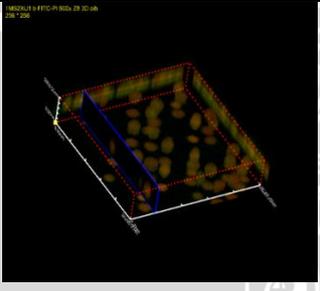
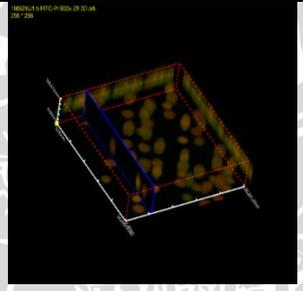
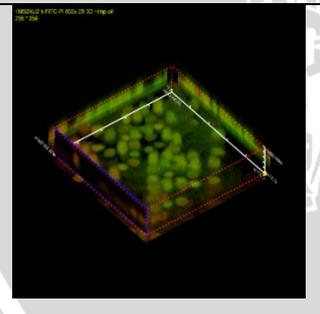
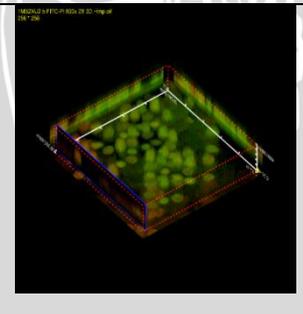
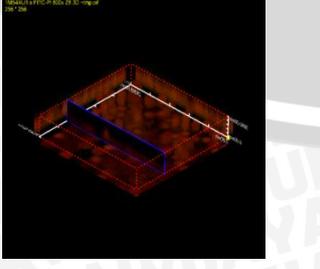
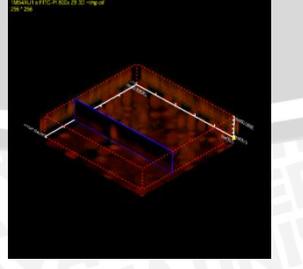
13	1 ms 6x ulangan 2		1550
14	Kontrol II		290

Keterangan :

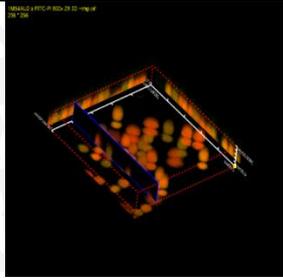
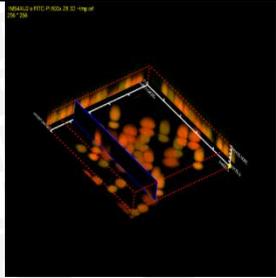
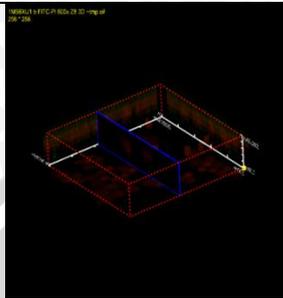
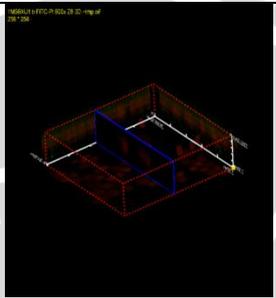
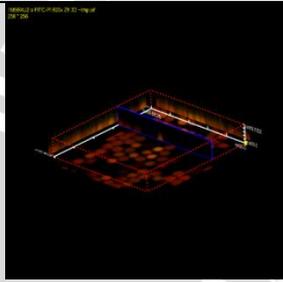
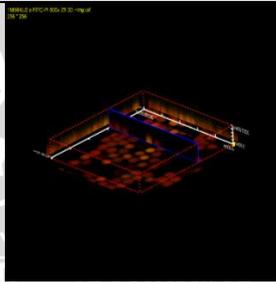
-  = Intensitas tinggi
-  = Intensitas sedang
-  = Intensitas rendah

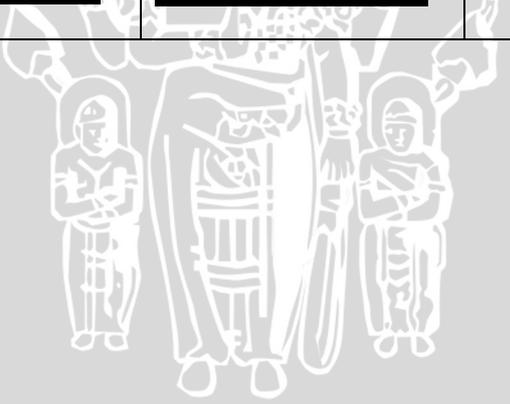
Lampiran 9. Hasil Pengamatan Daerah Integrasi GFP pada Sperma dengan Mikroskop Konfokal

No	Perlakuan	Tepi	Tengah	Persentase Integritas hingga inti
2	0,5 ms 2x ulangan 1			0% (pendaran sperma hanya menunjukkan warna merah menyala)
3	0,5 ms 2x ulangan 2			22,22 %
4	0,5 ms 4x ulangan 1			42,55 %
5	0,5 ms 4x ulangan 2			23,52 %

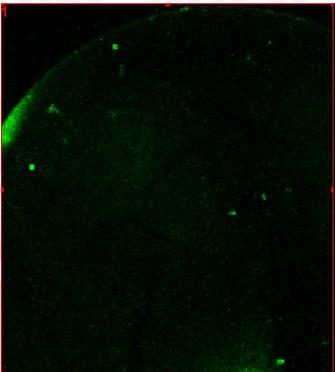
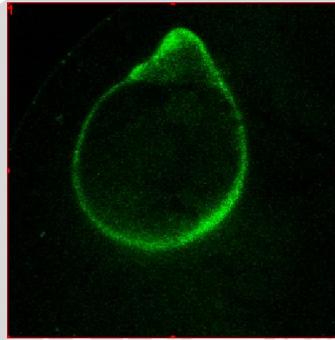
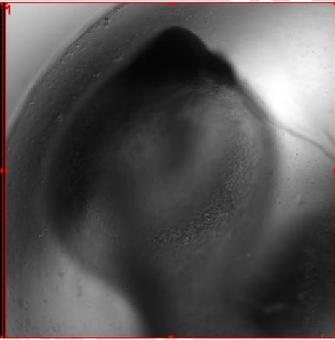
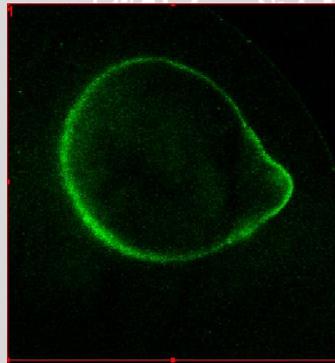
6	0,5 ms 6x ulangan 1			46,51%
7	0,5 ms 6x ulangan 2		-	60 %
8	1 ms 2x ulangan 1			22,00 %
9	1 ms 2x ulangan 2			17,39 %
10	1 ms 4x ulangan 1			0 % (Pendaran sperma hanya menunjukkan warna merah menyala)

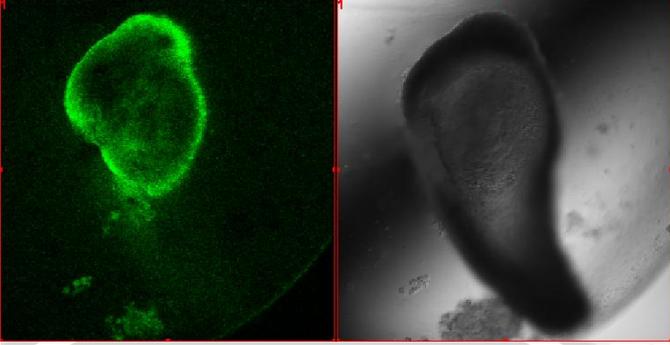
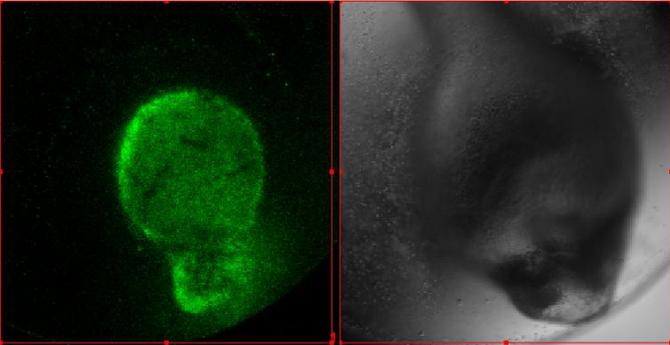
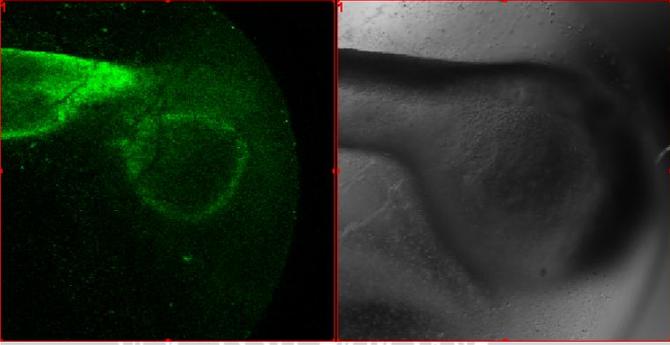
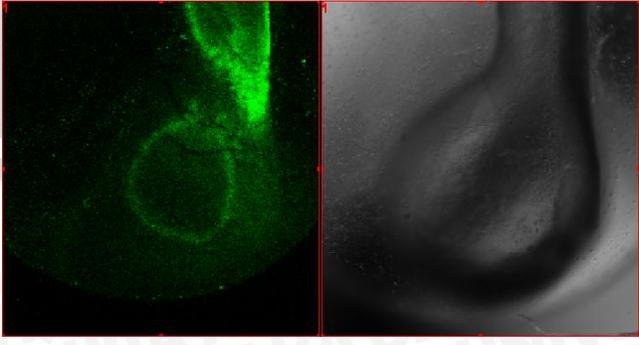


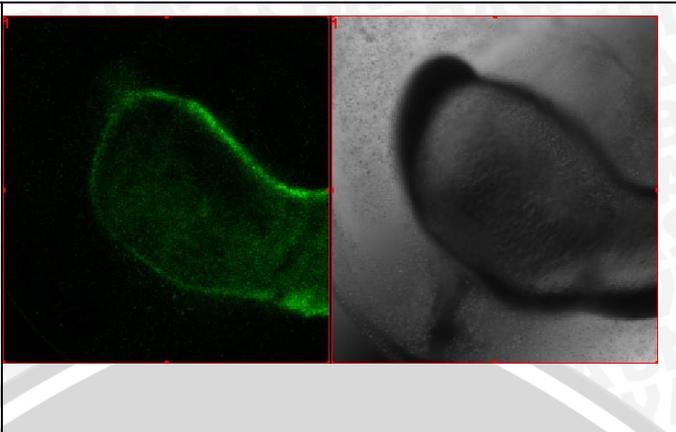
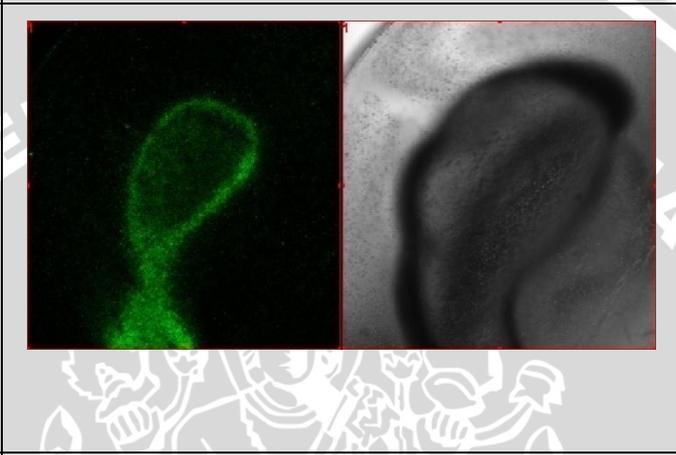
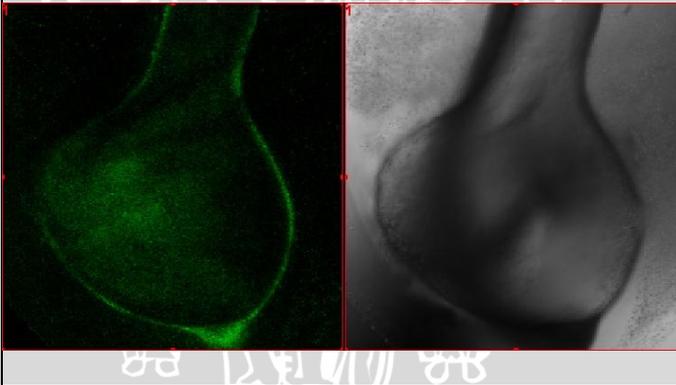
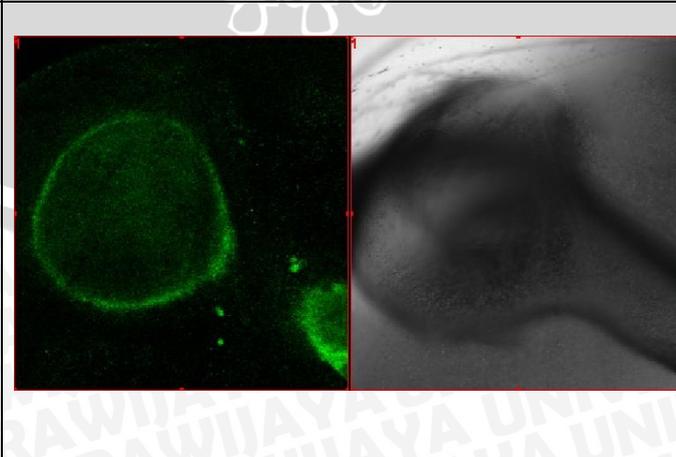
<p>11</p>	<p>1 ms 4x ulangan 2</p>			<p>65%</p>
<p>12</p>	<p>1 ms 6x ulangan 1</p>			<p>0% (pendaran sperma hanya menunjukkan warna merah)</p>
<p>13</p>	<p>1 ms 6x ulangan 2</p>			<p>42,59 %</p>



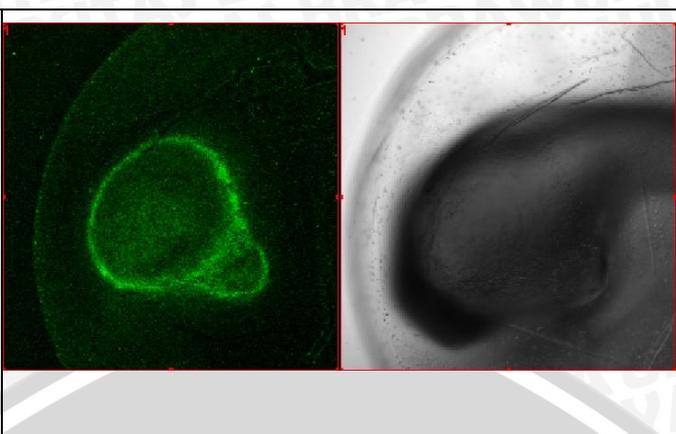
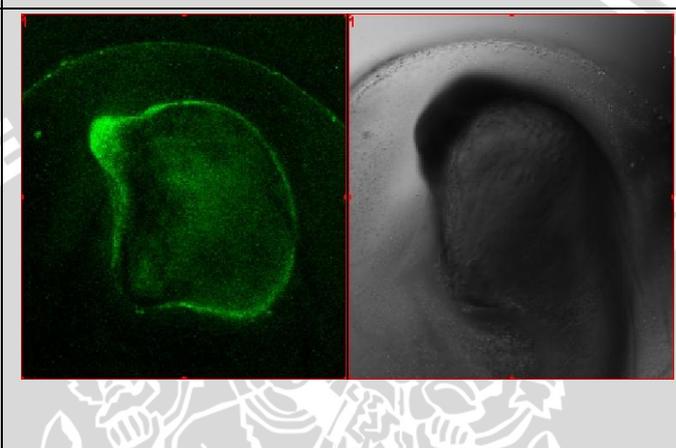
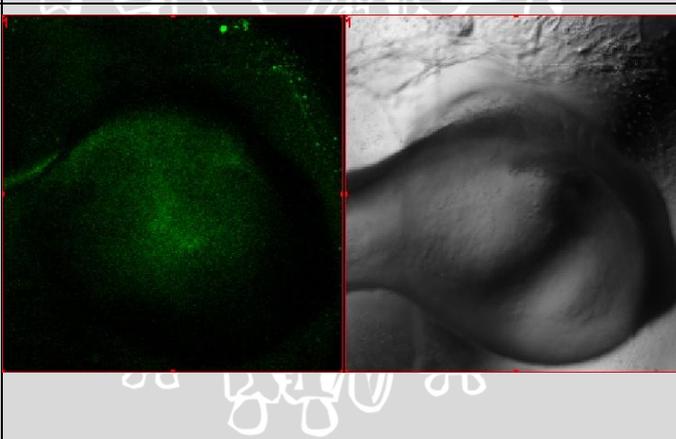
Lampiran 10. Hasil Pengamatan Fluoresensi Embrio (perbesaran 50x)

No	Perlakuan	Tampilan GFP	Tampilan DIC
1	Kontrol I		
2	0,5 ms 2x ulangan 1		
3	0,5 ms 2x ulangan 2		
4	0,5 ms 4x ulangan 1		

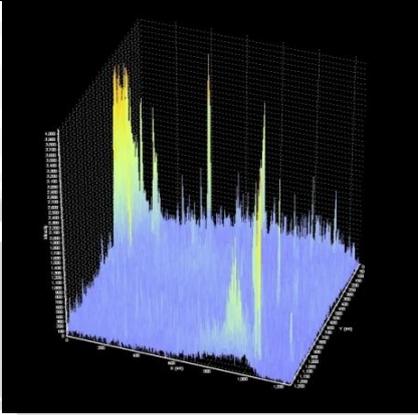
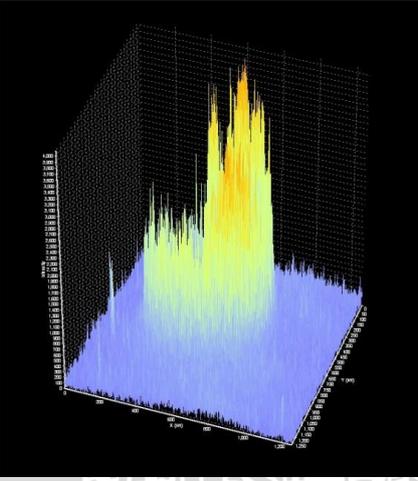
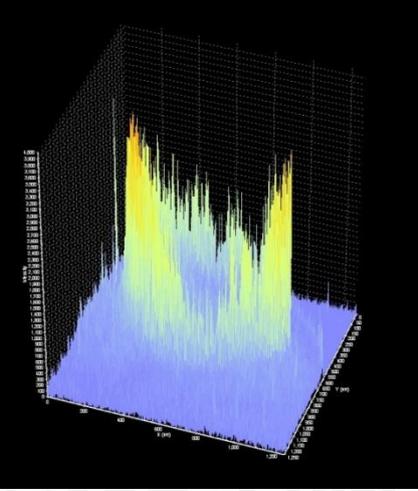
		
5	0,5 ms 4x ulangan 2	
6	0,5 ms 6x ulangan 1	
7	0,5 ms 6x ulangan 2	

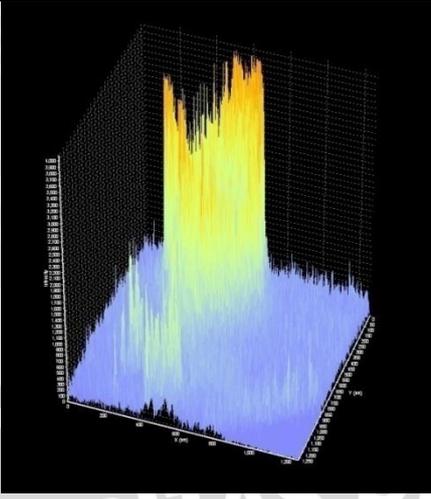
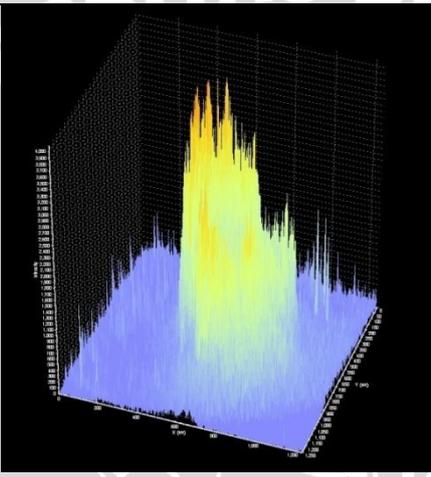
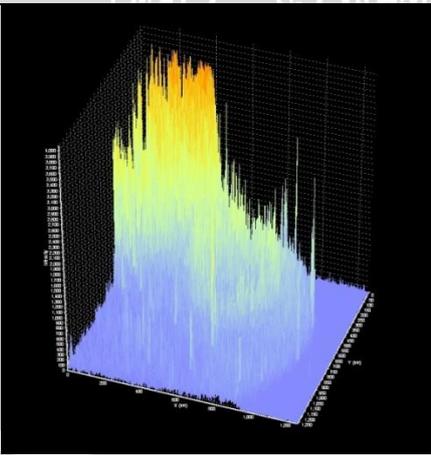
8	1 ms 2x ulangan 1	
9	1 ms 2x ulangan 2	
10	1 ms 4x ulangan 1	
11	1 ms 4x ulangan 2	

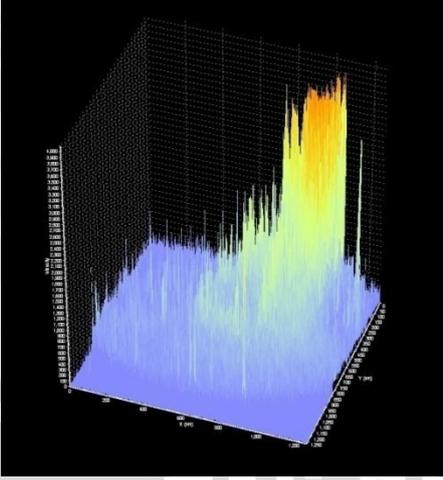
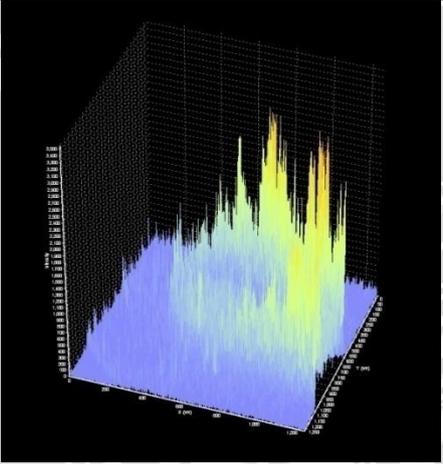
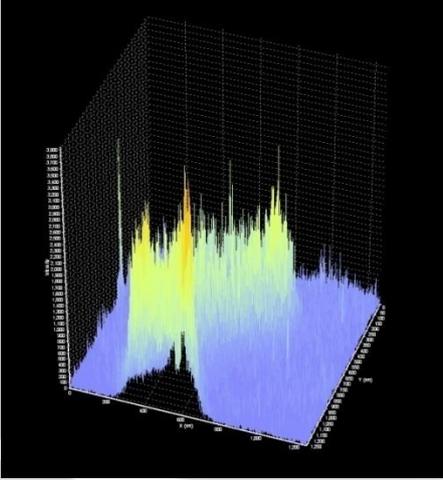


12	1 ms 6x ulangan 1	
13	1 ms 6x ulangan 2	
14	Kontrol II	

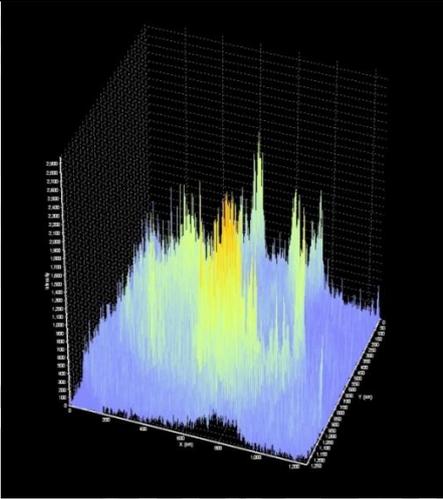
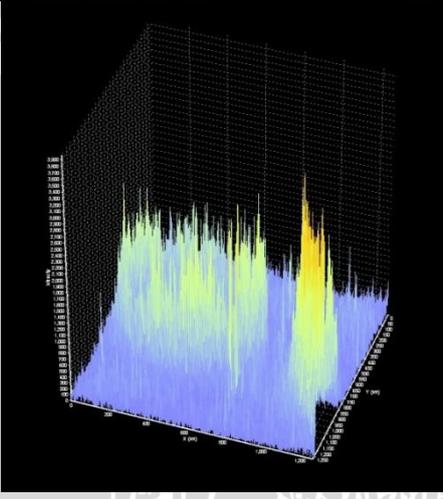
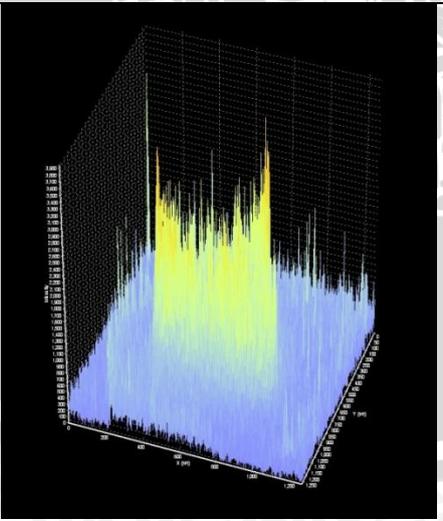
Lampiran 11. Hasil Analisa Intensitas Pendaran GFP pada Embrio

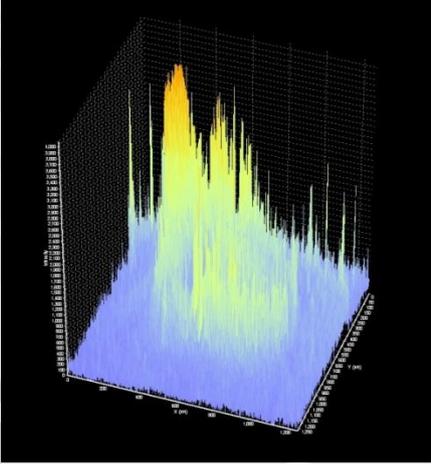
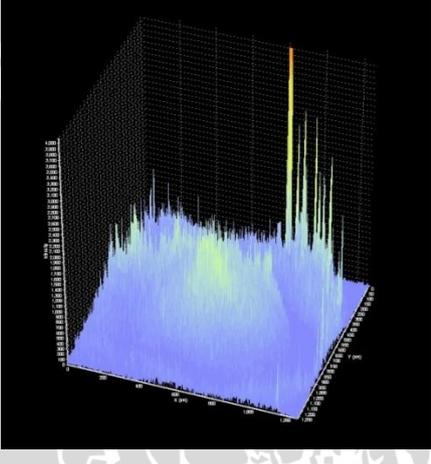
No	Perlakuan	Grafik Intensitas	Nilai Intensitas tertinggi
1	Kontrol I		3800 (Terjadi diluar sperma)
2	0,5 ms 2x ulangan 1		3850
3	0,5 ms 2x ulangan 2		2500

<p>4</p>	<p>0,5 ms 4x ulangan 1</p>		<p>3950</p>
<p>5</p>	<p>0,5 ms 4x ulangan 2</p>		<p>3300</p>
<p>6</p>	<p>0,5 ms 6x ulangan 1</p>		<p>3700</p>

7	0,5 ms 6x ulangan 2		3800
8	1 ms 2x ulangan 1		2600
9	1 ms 2x ulangan 2		1700



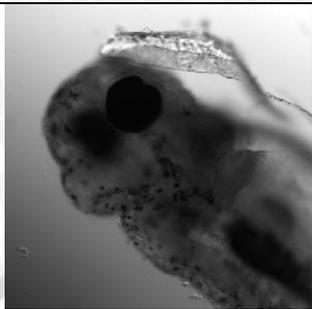
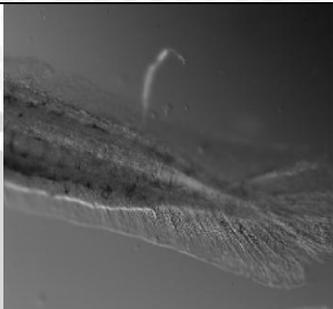
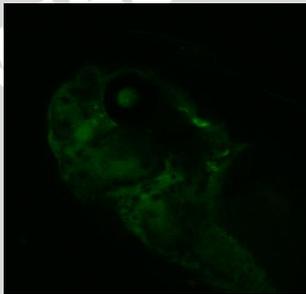
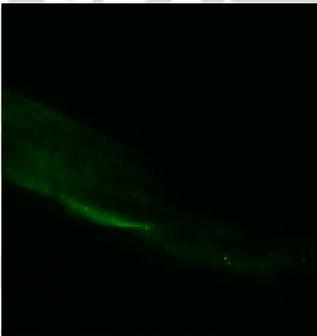
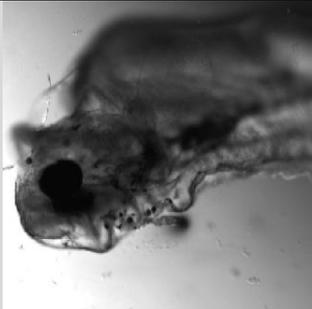
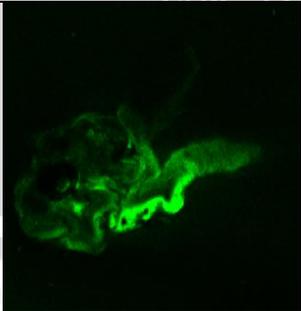
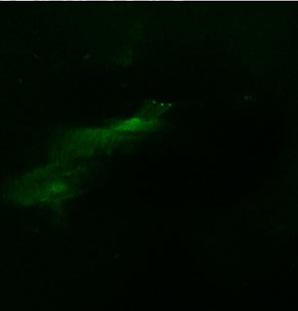
<p>10</p> <p>1 ms 4x ulangan 1</p>		<p>1200</p>
<p>11</p> <p>1 ms 4x ulangan 2</p>		<p>2000</p>
<p>12</p> <p>1 ms 6x ulangan 1</p>		<p>3000</p>

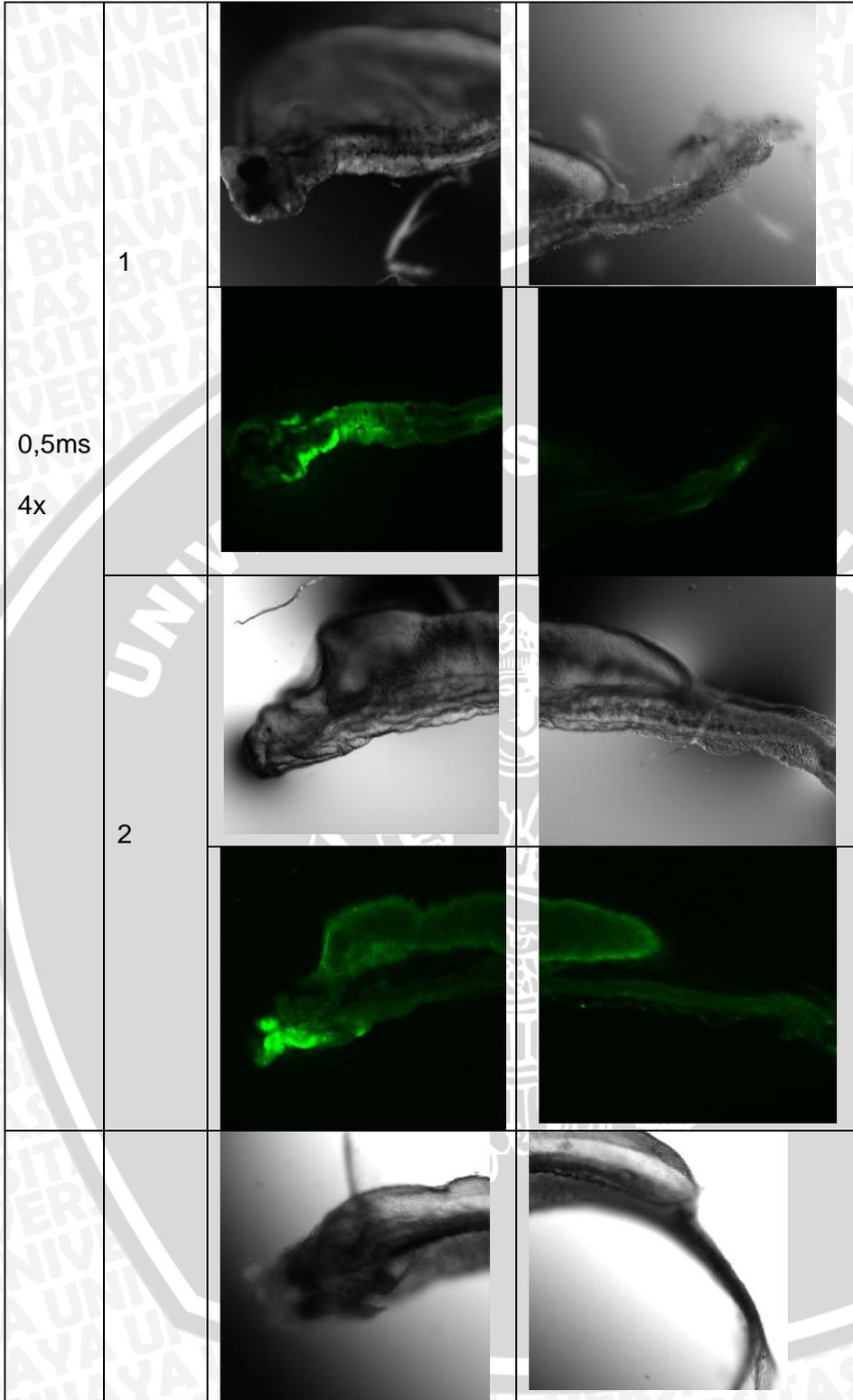
13	1 ms 6x ulangan 2		3400
14	Kontrol II		4000

Keterangan :

-  = Intensitas tinggi
-  = Intensitas sedang
-  = Intensitas rendah

Lampiran 12. Ekspresi GFP pada Larva

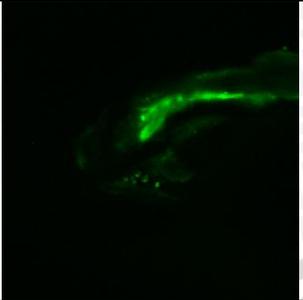
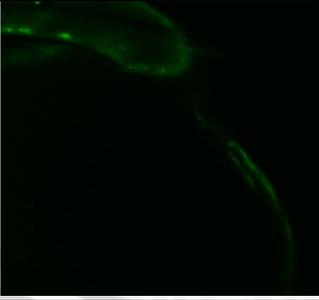
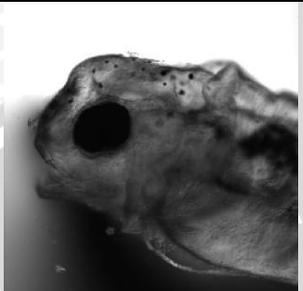
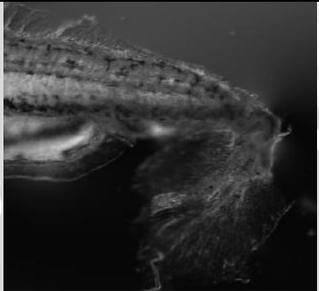
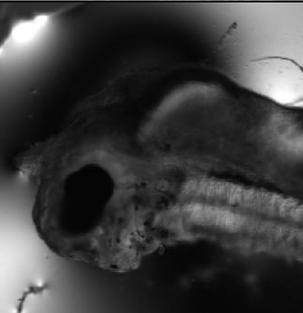
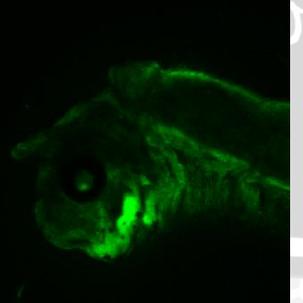
Perla- -kuan	Ulang- -an	Kepala	Perut
Kontrol			
			
0,5ms 2x	1		
			
	2	-	-
		-	-



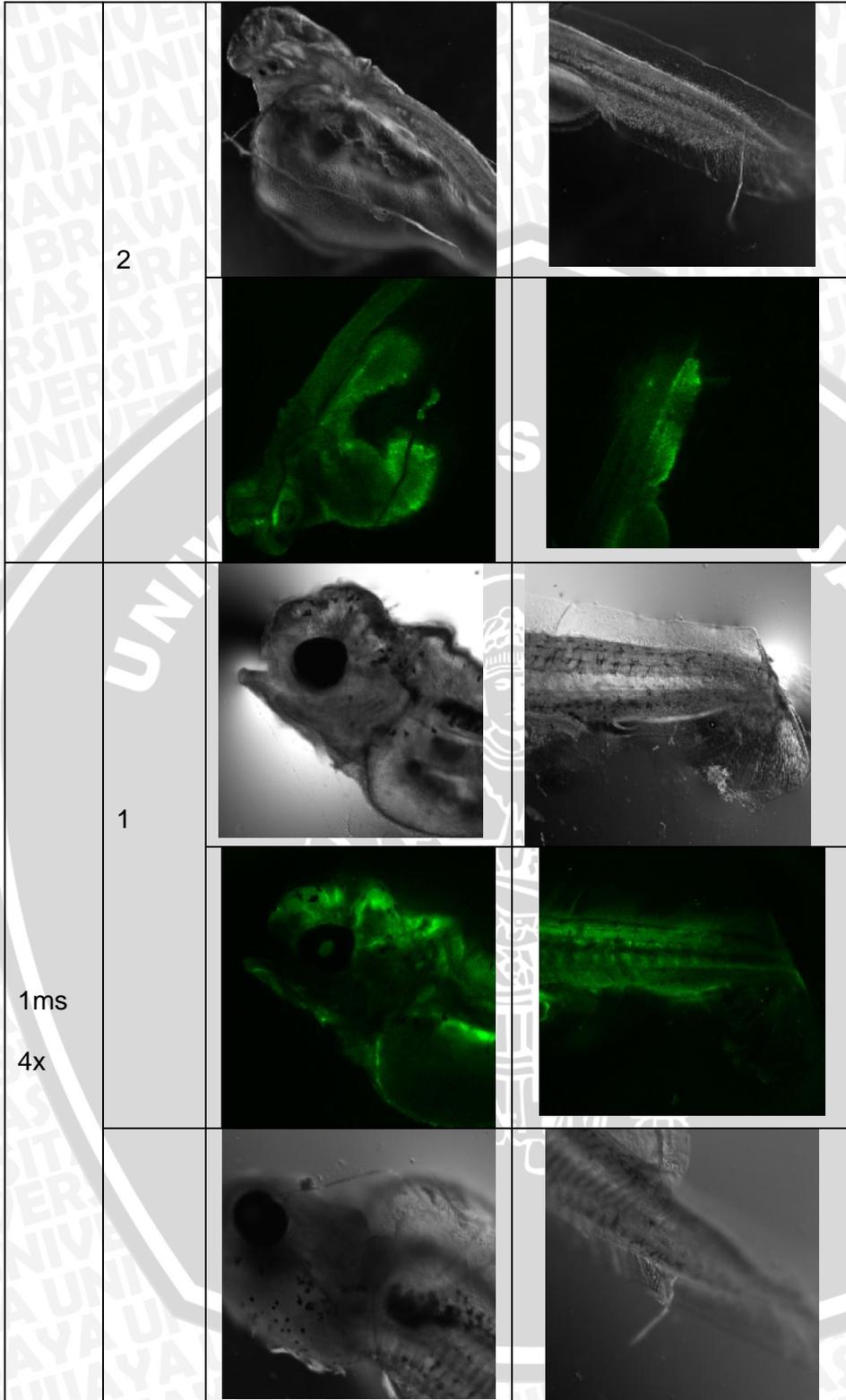
0,5ms

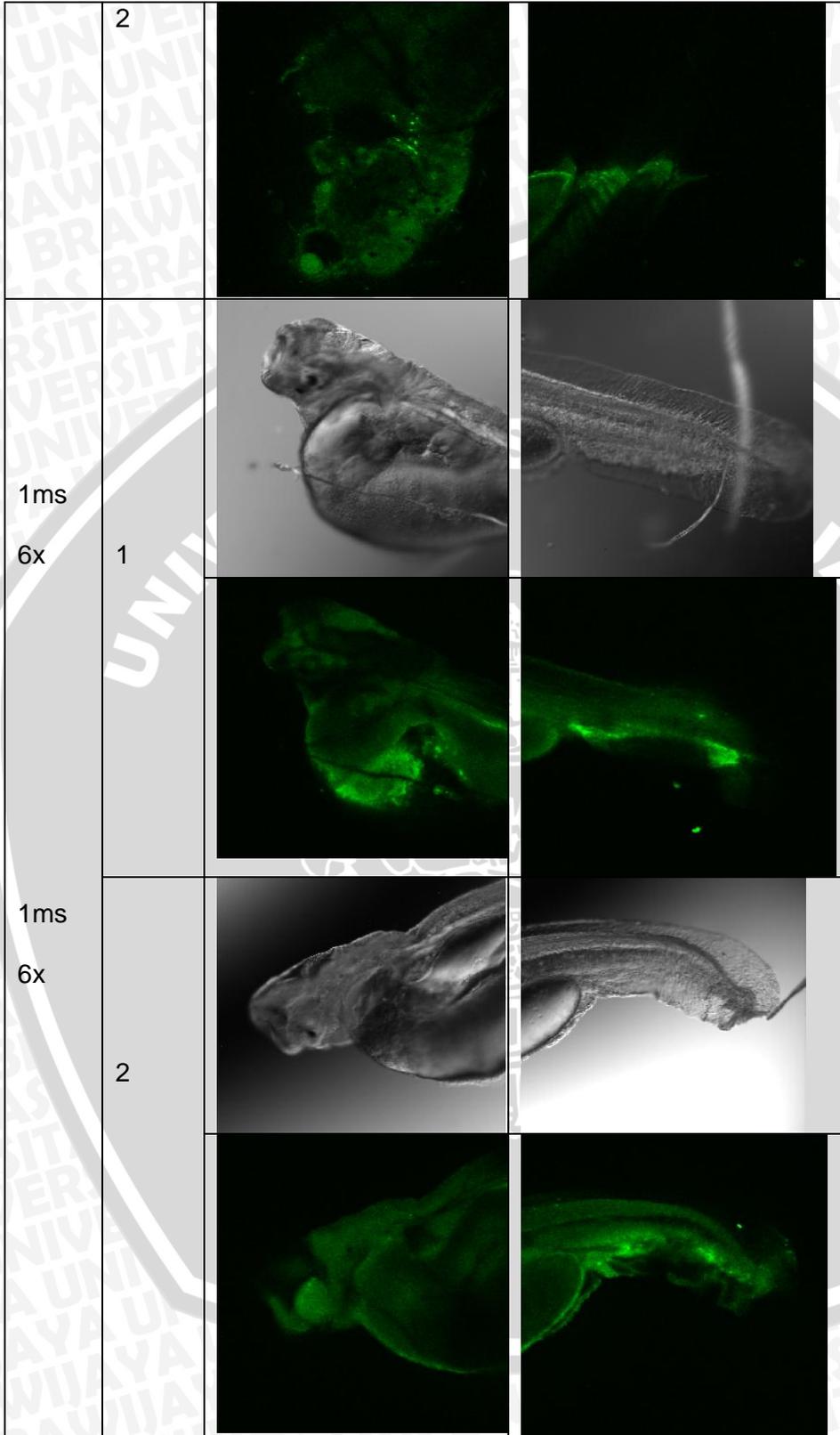
4x



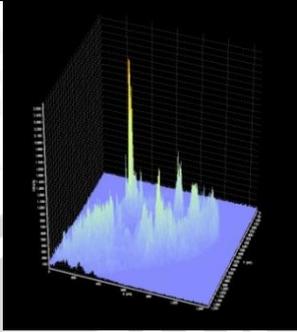
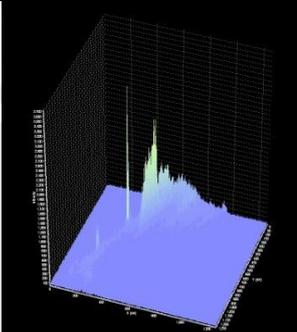
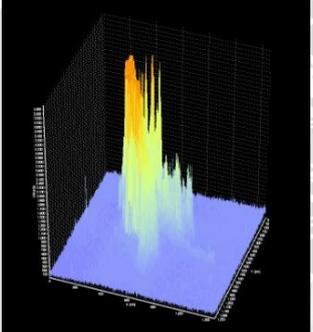
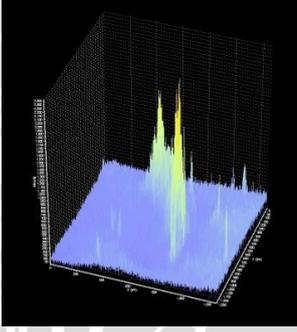
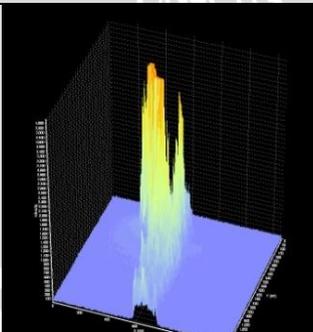
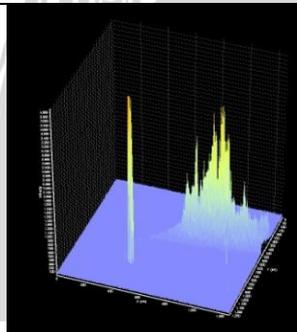
0,5ms 6x	1		
0,5ms 6x	2		
1ms 2x	1		
			

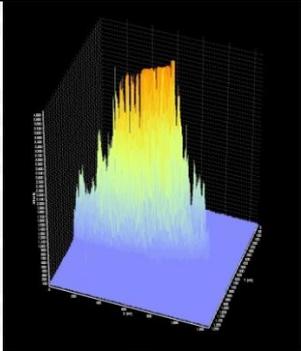
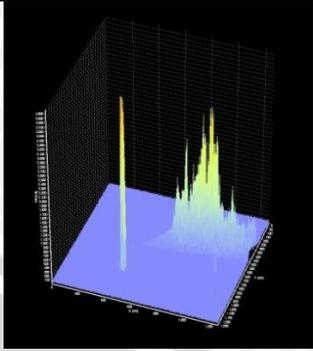
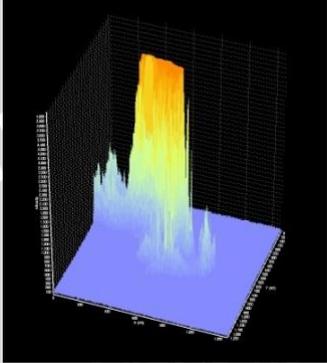
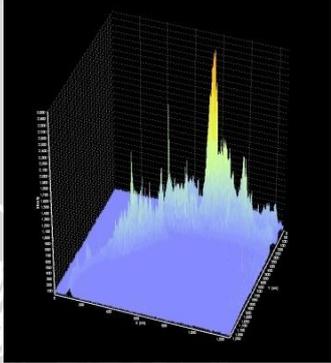
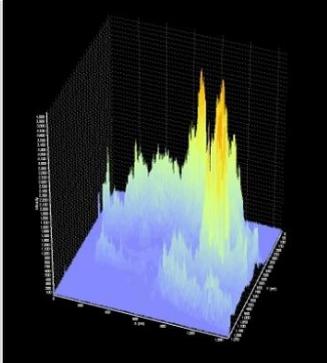
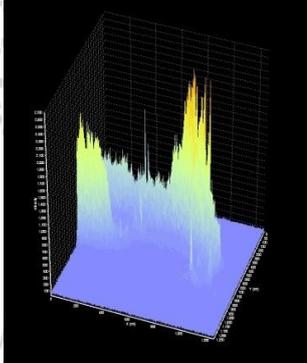
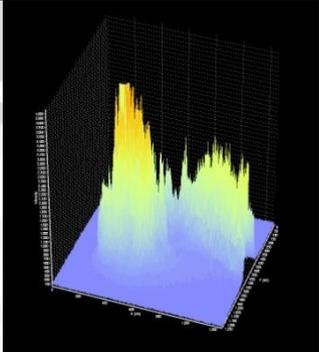
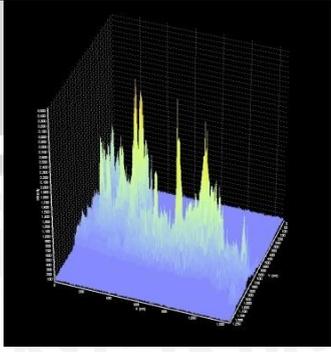


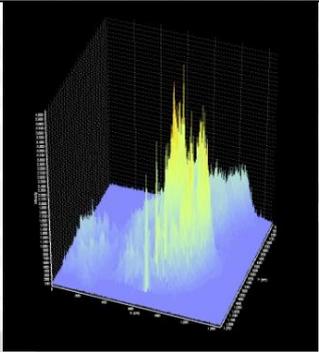
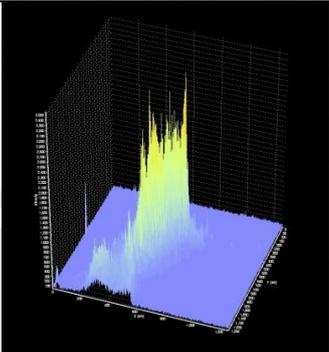
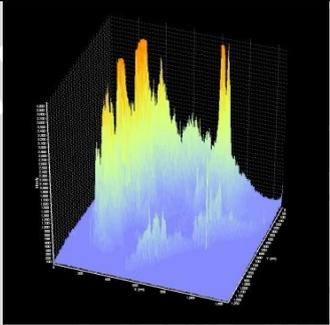
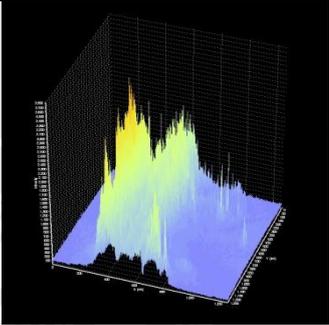
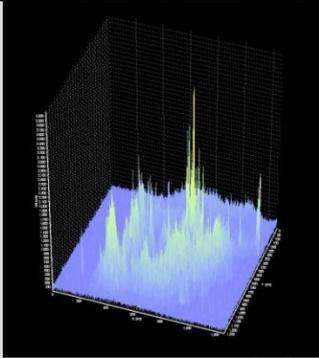
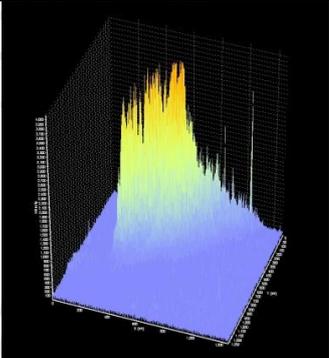


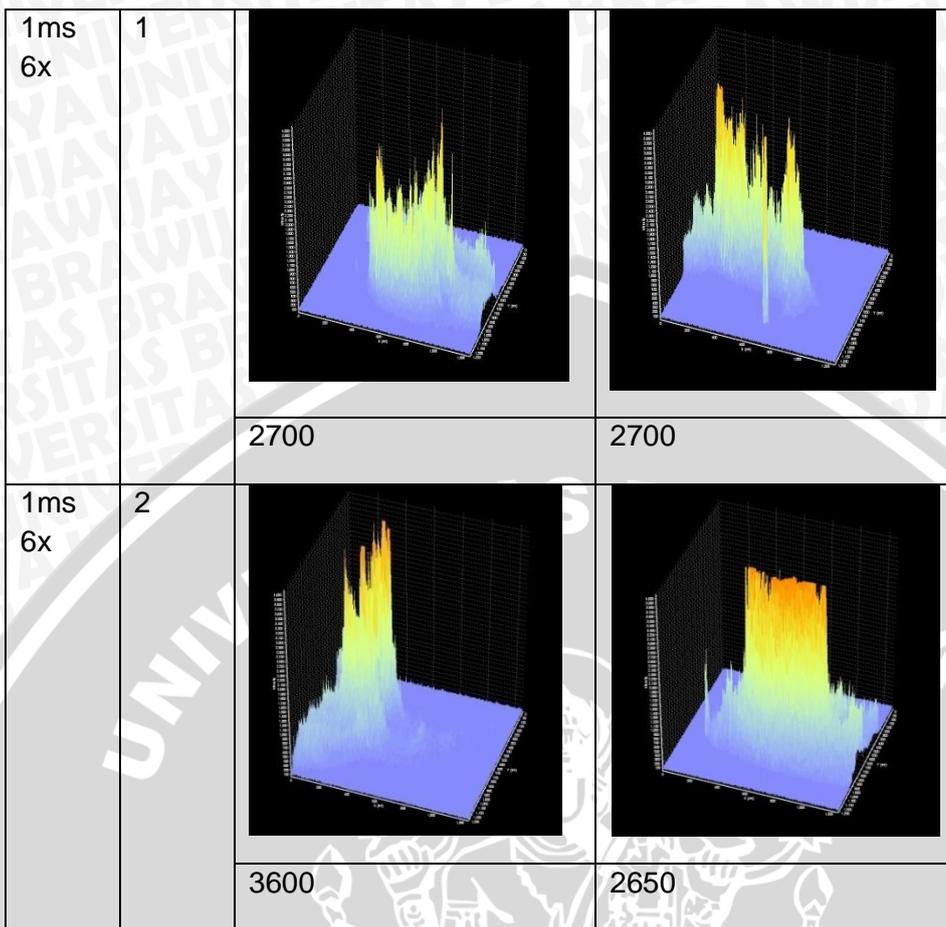


Lampiran 13. Hasil Analisa Intensitas Pendaran GFP pada Larva

Perla- kuan	Ulang- -an	Kepala	Ekor
Kontrol			
		2900	1800
0,5ms 2x	1		
		3500	1650
	2	-	-
0,5ms 4x	1		
		3400	2000

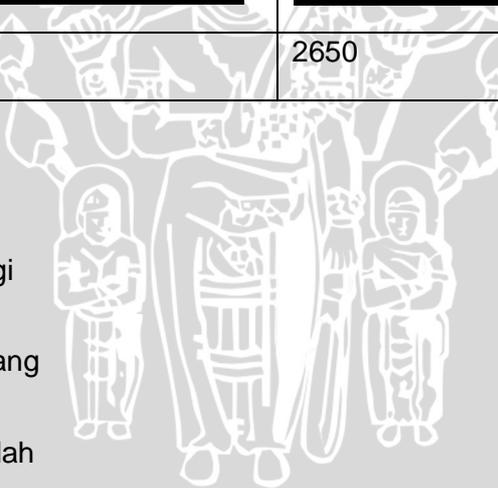
0,5ms 4x	2		
		3300	2250
0,5ms 6x	1		
		3600	3400
0,5ms 6x	2		
		3600	2300
1ms 2x	1		

		2500	2300
1ms 2x	2		
		3300	2850
1ms 4x	1		
		3900	2300
	2		
		2600	3400



Keterangan :

-  = Intensitas tinggi
-  = Intensitas sedang
-  = Intensitas rendah



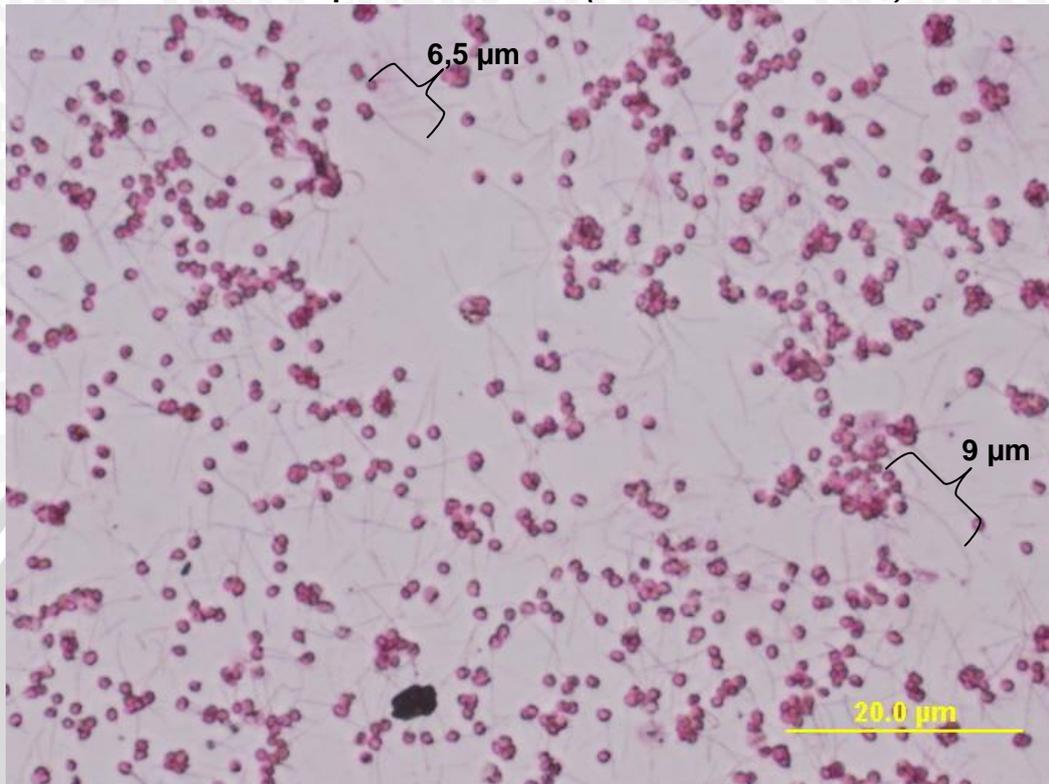
Lampiran 14. Perhitungan Konsentrasi Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

Perhitungan konsentrasi sperma dilakukan dengan mengalikan hasil yang diperoleh dari penjumlahan pada seluruh 5 bidang pandang kemudian dikalikan dengan 256 dan dibagi 5, karena pengamatan dilakukan pada 5 bidang pandang yang masing-masing memiliki luasan $1/256 \text{ mm}^3$. Setelah itu dikalikan dengan 10^4 karena volume *haemocytometer* pada luasan 1 mm^3 adalah $0,1 \text{ mm}^3$. Sehingga bila dikonversikan pada ml maka diperoleh 10^{-4} . Langkah berikutnya dikalikan dengan faktor pengencerannya yaitu 100x. Secara lebih jelasnya dapat dilihat pada perhitungan dibawah ini :

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

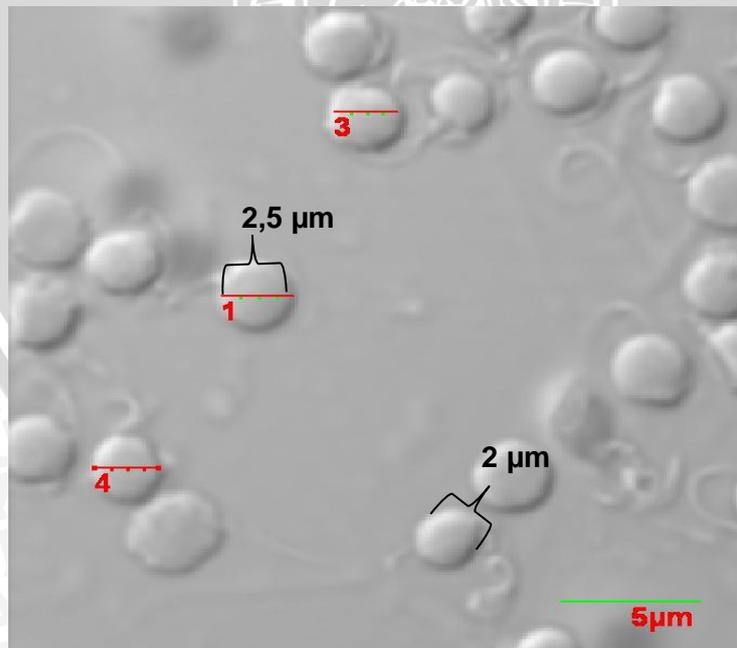
Lampiran 15: Ukuran Dimensi Sel Sperma

- **Ukuran Dimensi Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus Hasseltii*)**



Rata-rata panjang sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasseltii*) adalah 7,7μm

- **Dimensi Ukuran Besaran Kepala Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasseltii*) (Perbesaran 2400x)**



Rata-rata diameter kepala sperma ikan Nilem adalah 2,25 μm

Lampiran 16: Data Mortalitas Sperma Ikan Nilem (*Ostheochilus hasselti*)

Rumus Mortalitas:
$$\frac{\sum \text{spermatati}}{\sum \text{total sperma}} \times 100\%$$

NO	PERLAKUAN	MATI	HIDUP	TOTAL	RATA-RATA%	Rerata %
1	PRA	120	135	255	47,05	47,05
2	0,5ms 2x u1	22	67	89	24,71	40,22
3	0,5 ms 2x u2	68	54	122	55,73	
4	0,5 ms 4x u1	56	120	176	31,81	34,99
5	0,5 ms 4x u2	42	68	110	38,18	
6	0,5 ms 6x u1	166	120	286	58,04	57,63
7	0,5 ms 6x u2	87	65	152	57,23	
8	1 ms 2x u2	62	15	77	80,51	79,14
9	1ms 2x u2	70	20	90	77,77	
10	1ms 4x u1	120	100	220	54,54	57,27
11	1ms 4x u2	150	100	250	60,00	
12	1ms 6x u1	185	80	265	69,81	66,48
13	1ms 6x u2	60	35	95	63,15	
14	K post	50	120	170	29,41	29,41



Lampiran 17 : Data Viabilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*)

Perlakuan	Jam mulai pengamatan	Jam terakhir pengamatan (mati)	Selang waktu	Rerata waktu
Kontrol I	09.00	10.34	94 menit	94 menit
0,5 ms 2x ¹	09.10	10.25	75 menit	69 menit
0,5 ms 2x ²	9.23	10.20	63 menit	
0,5 ms 4x ¹	10.24	11.02	42 menit	74,5 menit
0,5 ms 4x ²	10.26	11.11	65 menit	
0,5 ms 6x ¹	10.27	11.28	61 menit	50,5 menit
0,5 ms 6x ²	10.35	11.15	40 menit	
1 ms 2x ¹	10.37	11.25	48 menit	54 menit
1 ms 2x ²	10.37	11.27	60 menit	
1 ms 4x ¹	10.40	11.40	60 menit	68,5 menit
1 ms 4x ²	10.43	12.00	77 menit	
1 ms 6x ¹	10.46	11.26	40 menit	55 menit
1 ms 6x ²	10.50	12.00	70 menit	
Kontrol II	11.00	13.03	123 menit	123 jam

