

EKSPRESI GEN *GREEN FLUORESCENT PROTEIN* (GFP) PADA SPERMA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) DENGAN METODE ELEKTROPORASI DAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY* (CLSM)

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

Oleh :
DESI RETNO DININGRUM
NIM. 0510850017



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2011**

EKSPRESI GEN *GREEN FLUORESCENT PROTEIN* (GFP) PADA SPERMA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) DENGAN METODE ELEKTROPORASI DAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY* (CLSM)

SKRIPSI

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana

Oleh :

DESI RETNO DININGRUM

NIM. 0510850017



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

MALANG

2011

EKSPRESI GEN *GREEN FLUORESCENT PROTEIN* (GFP) PADA SPERMA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) DENGAN METODE ELEKTROPORASI DAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY* (CLSM)

Oleh :

DESI RETNO DININGRUM

NIM. 0510850017

Telah dipertahankan didepan penguji pada tanggal 2 Februari 2011 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

(Ir. Muhammad Fadjar, MS)
Tanggal :

Dosen Penguji II

(Ir. Soelistyowati)
Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Agoes Soeprijanto, MS)
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Ir. Abd. Rahem Faqih, MS)
Tanggal :

Mengetahui

Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
Tanggal :

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan karunia, rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul ‘Ekspresi Gen *Green Fluorescent Protein* (GFP) pada Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dengan Metode Elektroporasi dan Menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM)’.

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 skripsi ini dapat memberikan informasi bagi para pembaca dan mendorong perkembangan teknologi molekular dalam bidang perikanan.

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

Malang, 1 Desember 2010

Penulis

RINGKASAN

DESI RETNO DININGRUM. Ekspresi Gen *Green Fluorescent Protein* (GFP) pada Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dengan Metode Elektroporasi dan Menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM). Dibawah bimbingan **Dr. Ir. AGOES SOEPRIJANTO, MS** dan **Ir. ABD. RAHEM FAQIH, MS**

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 penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) pada tegangan listrik 40 volt terhadap pergerakan (motilitas) sperma, kemampuan hidup (mortalitas) sperma, kemampuan sperma membuahi telur (fertilitas) serta gambaran ekspresi gen GFP pada sperma, embrio dan larva ikan mas (*Cyprinus carpio*). Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial 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, masing-masing menggunakan kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Breeding dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang pada Bulan November 2009 sampai April 2010.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa pemberian lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) pada tegangan listrik 40 Volt didapatkan bahwa ekspresi gen *Green Fluorescent Protein* (GFP) pada sperma dengan nilai intensitas tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 4x (3600 arbitrary), embrio hasil fertilisasi dengan nilai intensitas tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 4x (4000 arbitrary) dan larva setelah menetas dengan nilai intensitas tertinggi pada perlakuan 1ms 4x (bagian kepala 4000 arbitrary, perut 3400 arbitrary dan ekor 4000 arbitrary).

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

Hubungan antara *Pulse length* dengan integrasi GFP berupa regresi linier dengan persamaan $y = 54,11 - 44,38x$ sedangkan hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan integrasi GFP berupa regresi kuadratik dengan persamaan $y = -84,06 + 81,45x - 11,24x^2$ (untuk 0,5 ms) sedangkan untuk 1 ms tidak ada hubungan dengan persentase integrasi GFP pada inti sperma tertinggi pada lama kejutan 0,5 ms (31,92%) dengan jumlah kejutan 3,62 kali (63,23%). Hubungan antara *Pulse length* dengan motilitas berupa regresi linier dengan persamaan $y=39,16 + 30x$, hubungan antara *Pulse number* dengan motilitas berupa regresi kuadratik dengan persamaan $y=30,01+20,31x- 2,65x^2$ sedangkan hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan

motilitas berupa regresi kuadratik dengan persamaan $y = 12,5 + 29,38x - 4,06x^2$ (untuk 0,5 ms) sedangkan untuk 1 ms tidak ada hubungan. Hubungan antara *Pulse length* dengan mortalitas berupa regresi linier dengan persamaan $y = -61,55 + 148,13x$ sedangkan hubungan antara *Pulse number* dengan mortalitas berupa regresi kuadratik dengan persamaan $y = 67,51 - 15,175x + 2,29x^2$. Hubungan antara *Pulse length* dengan fertilitas berupa regresi linier dengan persamaan $y = 17,26 + 15,77x$, hubungan antara *Pulse number* dengan fertilitas berupa regresi kuadratik dengan persamaan $y = -40,99 + 39,02x - 4,61x^2$ sedangkan hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan fertilitas berupa regresi kuadratik dengan persamaan $y = -82,69 + 61,68x - 7,44x^2$ (untuk 0,5 ms) sedangkan untuk 1 ms tidak ada hubungan.

Kualitas air media penetasan telur berada dalam kondisi normal dengan nilai suhu 26-27°C, pH 7,8 dan DO 6 ppm.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan bahwa pada proses pembuatan ikan transgenik berdasarkan metode elektroporasi menggunakan tegangan listrik 40 volt, lama kejutan 0,5ms dan jumlah kejutan 4x agar didapatkan nilai motilitas, fertilitas dan integrasi GFP pada inti sperma yang tinggi sebaiknya dengan konsentrasi DNA (GFP) 60ng



DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	i
UCAPAN TERIMAKASIH	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesa.....	3
1.5 Kegunaan Penelitian.....	4
1.6 Tempat dan Waktu.....	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Mas.....	5
2.1.1 Klasifikasi.....	5
2.1.2 Morfologi dan Biologi.....	5
2.1.3 Kebiasaan Hidup Ikan Mas.....	6
2.1.4 Kebiasaan Makan.....	7
2.1.5 Ciri-ciri Ikan Mas Matang Gonad.....	7
2.2 Sperma Ikan.....	8
2.2.1 Morfologi Sperma.....	9
2.2.2 Motilitas Sperma.....	10
2.2.3 Mortalitas dan Viabilitas Sperma.....	11
2.2.4 Spermatogenesis.....	12
2.2.5 Larutan Buffer Sperma.....	14
2.2.6 Biokimiawi Cairan Seminal.....	15
2.3 Sperma sebagai media Transfer Gen.....	15
2.4 Pengaruh Tegangan Elektroporasi dalam Proses Transfer Gen.....	16
2.5 GFP sebagai Marker Biologi.....	20
2.6 Promoter β -actin.....	23
2.7 Confocal Laser Scanning Microscopy.....	24
2.8 Propidium Iodide.....	29
2.9 Ekspresi Gen.....	30
3 MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi penelitian.....	33
3.1.1 Alat.....	33
3.1.2 Bahan.....	34
3.2 Metode Penelitian.....	33
3.3 Rancangan Penelitian.....	34

3.4	Prosedur Penelitian.....	36
3.4.1	Persiapan Penelitian.....	36
3.4.2	Pelaksanaan Penelitian.....	37
3.5	Parameter Penelitian.....	44
3.5.1	Parameter Utama.....	44
3.5.2	Parameter Penunjang.....	44
4	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Ekspresi gen GP.....	45
4.2	Motilitas Sperma Kontrol.....	59
4.3	Motilitas Sperma Perlakuan.....	60
4.4	Mortalitas dan Viabilitas Sperma Kontrol.....	67
4.5	Mortalitas dan Viabilitas Sperma Perlakuan.....	69
4.6	Fertilitas Sperma.....	77
4.7	Daya Tetas Telur.....	83
4.8	Kualitas Air.....	86
5	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan.....	88
5.2	Saran.....	89

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya perikanan akhir-akhir ini mengalami beberapa masalah. Masalah yang cukup mengkhawatirkan dan sudah lama terjadi adalah adanya penurunan kualitas genetik pada ikan. Pertumbuhan ikan semakin lambat, rentan terhadap perubahan lingkungan serta tidak tahan pada serangan penyakit. Beberapa permasalahan perikanan budidaya ikan tersebut dapat diatasi dengan rekayasa genetik, Transgenesis.

Teknologi DNA rekombinan (rDNA) merupakan rekayasa genetik yang memungkinkan kombinasi ulang (rekombinasi) atau penggabungan ulang gen dari sumber yang berbeda secara *in vitro* (Karim, 2002). Definisi 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 (Hovath dan Orban, 1995).

Dalam teknologi transgenik, telah dikembangkan beberapa teknik transfer gen yang digunakan yaitu mikroinjeksi, elektroporasi, biolistik dan lipofeksi. Teknik mikroinjeksi dilakukan dengan cara menyuntikkan konstruksi gen ke dalam blastodisk telur yang sudah dibuahi dengan bantuan micromanipulator (Sucipto, 2008). Pada umumnya, menggunakan metode mikroinjeksi kurang efisien karena dapat menyebabkan kerusakan yang mempengaruhi kelangsungan hidup embrio dan dapat menghasilkan tingkat kematian yang tinggi (Beaumont, 2003). Sehingga alternatif yang digunakan untuk memperkecil masalah dalam teknik transfer gen adalah metode elektroporasi. Menurut Gagne *et al.*, (1991), dengan menggunakan elektroporasi menunjukkan DNA asing

dapat stabil didalam sperma dan lebih menguntungkan karena dapat mengurangi trauma akibat mikro injeksi. 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.

Metode sperma sebagai media tranfser 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).

Untuk mengetahui tingkat keberhasilan transfer gen yang dilakukan, maka perlu adanya media penyampaian informasi tersebut. Dan salah satu yang dapat melaksanakan tugas tersebut adalah GFP. GFP bisa digunakan sebagai reporter ekspresi gen, dimana GFP memiliki keunggulan yang tidak memerlukan suatu substrat sehingga deteksinya cukup menggunakan mikroskop. 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 (Anonymous, 2009a). penggunaan GFP dalam transgenik akan menjadi lebih mudah untuk melacak garis keturunan sel dan migrasi sel (Gong, 2004).

Keberhasilan penggunaan GFP sebagai marker biologi pada sperma dapat dibuktikan dengan dilakukannya pengamatan di bawah mikroskop konfokal, karena untuk mengetahui keberadaan GFP hanya memerlukan penyinaran dengan panjang gelombang sinar UV (Karunasagar, 1999).

1.2 Perumusan Masalah

Elektroporasi sperma sebagai media transfer gen, merupakan metode yang mudah dan cepat serta memiliki efektifitas yang tinggi jika dibandingkan dengan

metode yang lain. Namun adanya pemberian tegangan listrik (*voltase*), lama kejutan (*pulse length*) dan jumlah kejutan (*pulse number*) dalam elektroporasi dapat mempengaruhi kualitas sperma. Elektroporasi pada sperma yang telah tersisipi gen GFP sangat penting dilakukan, berdasarkan fungsi dari GFP itu sendiri yaitu untuk mengetahui efektifitasnya sebagai marker gen. Sehingga perlu diketahui integrasi DNA pada spermatozoa serta gambaran ekspresi gen GFP pada embrio dan larva berdasarkan metode *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM). Karena DNA GFP sebagai gen pelapor (*reporter genes*) dapat terintegrasi pada kepala sperma terutama di bagian nukleus. Sehingga DNA tersebut dapat masuk ke dalam telur waktu fertilisasi.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) pada tegangan listrik 40 volt terhadap ekspresi gen GFP pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan terhadap pergerakan (motilitas) sperma, kemampuan hidup (mortalitas) sperma, kemampuan sperma membuahi telur (fertilitas) serta gambaran ekspresi gen GFP pada sperma, embrio dan larva ikan mas (*Cyprinus carpio*).

1.4 Hipotesa

H₀ : Diduga pemberian lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) yang berbeda pada tegangan listrik 40 volt tidak akan mempengaruhi ekspresi gen GFP pada sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang dielektroporasi

H₁ : Diduga pemberian lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) yang berbeda pada tegangan listrik 40 volt akan mempengaruhi ekspresi gen GFP pada sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang dielektroporasi

1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan informasi mengenai penggunaan GFP yang efektif sebagai reporter gen serta penggunaan lama kejutan dan jumlah kejutan yang tepat pada tegangan listrik 40 volt dalam metode transfer gen berdasarkan metode elektroporasi.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Breeding dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang pada Bulan November 2009 sampai April 2010.



2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan mas (*Cyprinus carpio*)

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Saanin (1984) klasifikasi ikan mas seperti yang disajikan pada

Gambar 1 adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata
Kelas : Osteichthyes
Subkelas : Teleostei
Ordo : Ostariophysii
Subordo : Cyprinoidea
Famili : Cyprinidae
Genus : *Cyprinus*
Spesies : *Cyprinus carpio*



Gambar 1. Ikan mas (*Cyprinus carpio*)

2.1.2 Morfologi dan Biologi

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) menurut sejarahnya berasal dari daratan Cina dan Rusia. Ikan mas mempunyai bentuk badan agak memanjang pipih ke samping (*compressed*). Mulut (bibir) berada di ujung tengah (*terminal*), dapat disembulkan dan lunak (elastis). Memiliki kumis (barbel) 2 pasang (empat buah), kadang-kadang mempunyai sungut 1 pasang (*rudimentir*). Jari-jari sirip punggung (*dorsal*) yang kedua mengeras seperti gergaji. Sedangkan letak antara kedua sirip, punggung dan perut berseberangan. Sirip dada (*pectoral*) terletak di belakang tutup insang (*operculum*). Ikan mas tergolong sisik besar bertipe cycloid. Usus umumnya tidak begitu panjang jika dibandingkan dengan hewan

pemakan tumbuh-tumbuhan asli. Ikan mas tidak mempunyai lambung juga tidak bergigi/ompong, sehingga bila mencerna makanan sebagai pengganti penggerusnya adalah dengan *pharing* mengeras (Santoso, 1993).

Menurut Cahyono (2000), ikan mas berasal dari daerah iklim sedang di Asia dan Eropa. Ciri-ciri fisik ikan mas adalah sebagai berikut : pada sudut mulut terdapat dua pasang sungut peraba, ikan mas memiliki rumus sirip sebagai berikut D.III. 17-22; A.3.5; P.15; V.I 7-9 dan memiliki jumlah sisik pada linea lateralis sebanyak 35-39.

Fekunditas ikan mas sangat tinggi, berkisar antara 100.000 sampai 300.000 butir telur per kilogram berat badan dalam setiap siklus oogenesis. Diameter telur berkisar antara 1,24-1,42 milimeter dengan berat 0,86-1,41 miligram (Winarsih, 1996).

2.1.3 Kebiasaan Hidup Ikan Mas

Menurut Santoso (1993), Ikan mas yang dibudidayakan di areal perkolaman dapat dikawinkan sepanjang tahun (tidak mengenal musim). Tetapi di alam, misalnya sungai, danau ataupun genangan air lainnya, ikan mas memijah pada awal / sepanjang musim penghujan. Biasanya memijah pada perairan dangkal, setelah mengalami kekeringan musim kemarau dan menempelkan seluruh telurnya pada tanaman atau rerumputan di tepian perairan. Ikan mas dapat tumbuh normal, jika lokasi pemeliharaan berada pada ketinggian antara 150-1000 meter di atas permukaan laut, suhu air 20-25⁰C, pH air antara 7-8. Berbeda dengan ikan lele lokal (*Clarias batracus*) terutama pejantannya yang mempunyai sifat mengasuh anak-anaknya, pada ikan mas justru sebaliknya, tidak mau merawat keturunannya. Setelah melakukan tugasnya (kawin), ikan mas tidak menghiraukan lagi kelangsungan hidup anak-anaknya. Kebiasaan lain ikan mas di alam adalah selalu mencari tempat yang aman (terutama di tempat

yang ditumbuhi rumput) karena sifat telur ikan menempel (*adhesif*), sehingga para petani mempergunakan ijuk sebagai alat penempel telur yang lazim disebut kakaban. Selain ijuk dapat pula menggunakan bahan lain misalnya tali rapia atau tumbuhan air eceng gondok (*echornia crasipes*).

Pemijahan ikan mas biasanya terjadi antara jam 23.00 sampai menjelang subuh. Saat pemijahan biasanya terjadi kejar-mengejar di antara induk. Adegan ini biasanya dilakukan ikan mas pada malam hari yang sepi, ada kalanya induk betina meloncat-loncat karena dipepet terus oleh jantan. Perbandingan antara induk jantan dan betina adalah dengan perbandingan berat 1:1, artinya jika induk jantan seberat 4 kg, maka betinanya pun harus 4 kg juga (Santoso, 1993).

2.1.4 Kebiasaan Makan

Pada umur muda (ukuran 10 cm), ikan mas senang memakan jasad hewan atau tumbuhan yang hidup di dasar perairan/kolam, misalnya chironomidae, oligochaeta, tubificidae, epimidae, trichoptera, molusca dan sebagainya. Selain itu memakan juga protozoa dan zooplankton seperti copepoda dan cladocera. Hewan-hewan tersebut disedot bersama lumpur, diambil yang dapat dimanfaatkan dan sisanya dikeluarkan melalui mulut (Santoso, 1993).

2.1.5 Ciri-ciri Ikan Mas Matang Gonad

Membedakan kelamin ikan mas tidaklah sulit. Bagi petani yang berpengalaman cukup melihat tanda-tanda luar saja, ia sudah tahu yang mana ikan jantan dan betina. Namun untuk memastikan apakah ia benar-benar jantan atau betina dan siap untuk dipijahkan perlu diketahui ciri-cirinya secara pasti dan jelas. Menurut Santoso (1993), perbedaan antara ikan mas jantan dan betina yang matang gonad adalah sebagai berikut :

- Ikan mas jantan
 - Badan tampak ramping atau langsing

- Gerakannya lincah dan gesit
- Jika bagian perut diurut (perlahan-lahan) dari depan ke arah sirip ekor akan mengeluarkan cairan berwarna putih (sperma) seperti santan kelapa
- Ikan mas jantan mencapai matang kelamin relatif muda daripada betina, yaitu 8 bulan dengan berat badan 0,5 kg/ekor
- Ikan mas betina
 - Badan terutama bagian perut membesar atau buncit, bila diraba terasa lembek
 - Gerakannya lamban , memberi kesan malas bergerak
 - Jika perut diurut, akan mengeluarkan cairan berwarna kuning
 - Pada malam hari biasanya meloncat-loncat
 - Umur induk betina yang pantas dikawinkan berkisar antara 1,5-2 tahun dengan berat badan mencapai 2 kg lebih/ekor

2.2 Sperma ikan

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

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 disebut plasma seminal (Partodihardjo, 1987).

Soeparna (1980) mengemukakan bahwa spermatozoa merupakan sel padat dan sangat khas, tidak tumbuh atau membagi diri serta tidak mempunyai peranan fisiologis apapun pada hewan yang menghasilkannya, semata-mata hanya untuk membuahi telur pada jenis yang sama.

Banyaknya sperma yang dapat dikeluarkan dari satu ekor jantan bergantung kepada umur, ukuran dan frekwensi pengeluaran sperma. Volume sperma ikan mas yang dapat dikeluarkan per-ejakulasi adalah sebanyak 2,36 – 3,44 cc dengan rata-rata 2,90 cc. Jumlah spermatozoa per 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 (Ginzburg, 1972).

2.2.1 Morfologi Sperma

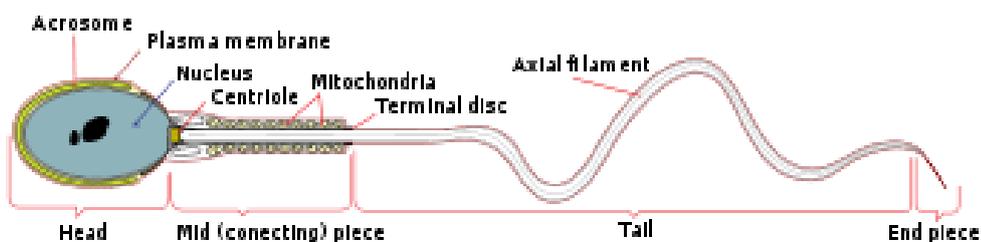
Spermatozoa terdiri dari dua bagian, yaitu kepala dan ekor. Tetapi ada pula spermatozoa yang memiliki tiga bagian, yaitu kepala, ekor dan tengah. Menurut Toelihere (1981), walaupun ukuran dan bentuk spermatozoa berbeda pada berbagai jenis hewan namun struktur morfologinya sama, yaitu terdiri dari kepala,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

Sperma dewasa terdiri dari tiga bagian yaitu kepala, bagian tengah dan ekor (flagellata). Kepala sperma mengandung nukleus. Bagian ujung kepala ini mengandung akrosom (tudung kepala sperma) yang menghasilkan enzim yang berfungsi untuk menembus lapisan – lapisan sel telur pada waktu fertilisasi. Bagian tengah sperma mengandung mitokondria yang menghasilkan ATP sebagai sumber energi untuk pergerakan sperma. Ekor sperma berfungsi sebagai alat gerak (Anonymous, 2009b). Menurut Nuraini (2009), reaksi akrosom adalah reaksi pelepasan anzim-enzim dari akrosom untuk menembus lapisan-lapisan oosit dengan diinduksi oleh protein-protein zona.

Campuran seminal plasma dengan spermatozoa disebut *milt*. Inti spermatozoa terdapat pada bagian kepala yang mengandung kromosom dan tiap kromosom mengandung gen pembawa sifat (Sumantadinata 1981).

Sel sperma mempunyai ukuran panjang keseluruhan 50 – 60 μm , dimana terdiri 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 . Sedangkan bagian ekor sperma, panjangnya kurang lebih 10 kali panjang kepala sperma (Anonymous, 2009b). Morfologi sperma ikan disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) (<http://solusiikanmas.blogspot.com>)

2.2.2 Motilitas sperma

Menurut Fujaya (2004), spermatozoa bersifat immotil dalam cairan plasmanya dan akan bergerak apabila bercampur dengan air. Pergerakan spermatozoa jarang berupa garis lurus, biasanya mereka berenang menikung atau mengarah berbentuk spiral. Gerak progresif secara berkesinambungan hanya terjadi 1 menit setelah bersentuhan dengan air dan hanya 50% yang masih dapat berenang setelah 3 menit. Lamanya spermatozoa motil dipengaruhi oleh umur dan kematangan spermatozoa, temperatur dan faktor-faktor lingkungan lain seperti ion-ion, pH dan osmolalitas. Sedangkan kecepatan Bergeraknya tergantung spesies.

Pergerakan spermatozoa dapat dipakai sebagai indikator kualitas spermatozoa, walaupun belum dapat menjamin terjadinya pembuahan yang berhasil (Harvey, 1979). Adapun kecepatan serta lamanya sperma bergerak bergantung kepada berbagai faktor, antara lain jenis serta konsentrasi unsur yang terkandung di dalamnya, suhu, pH dan metabolisme sel serta konsentrasi spermatozoa dalam cairan sperma (Baynes dan Scot, 1987).

Pergerakan sperma dipengaruhi pula oleh salinitas air. Umumnya pergerakan sperma ikan yang memijah dalam air laut lebih lama dibandingkan dengan dalam air tawar. Hal ini disebabkan karena air laut lebih banyak mengandung zat-zat yang terdapat dalam sperma (Harvey, 1979).

Harvey (1979) mengemukakan bahwa sperma ikan Hering (*Clupea herenous*) masih dapat bergerak 4 – 5 hari, sedangkan sperma ikan air tawar kebanyakan hanya selama 2 – 3 menit. Selanjutnya dikatakan oleh Ginzburg (1972), bahwa sperma ikan mas hanya hidup selama 30 – 60 detik dalam air. Sedangkan Pavlovici dan Vlad (1976) mengatakan bahwa lamanya pergerakan aktif spermatozoa ikan mas dalam air tawar dengan suhu 20°C kira-kira 106.6 detik.

Pengamatan untuk waktu motilitas spermatozoa dilakukan dengan mencatat waktu dalam satuan detik pada dua jenis motilitas: *fast progressive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak sangat cepat dengan arah maju ke depan) dan motilitas *slow proggesive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak cepat dengan arah maju ke depan) (Hidayaturrohmah, 2007).

2.2.3 Mortalitas dan Viabilitas Sperma

Pengamatan daya tahan hidup spermatozoa dilakukan dengan mencatat waktu viabilitas (menit) yaitu mulai bergerak lamban, bergerak berputar di tempat (reservoir), berdenyut lemah sampai tidak berdenyut lagi atau mati (Wahyu, 2009).

Menurut Partodihardjo (1987), penentuan kelangsungan hidup spermatozoa berdasarkan atas prinsip-prinsip sebagai berikut : (1) sperma yang hidup adalah sperma yang bergerak cepat, lambat atau sedikit pergerakannya pada kepala atau ekor, (2) sperma yang mati adalah sperma yang tidak memperlihatkan pergerakan sama sekali pada bagian kepala maupun ekor.

Pada penelitian ini menggunakan pewarna eosin negrosin untuk menentukan mortalitas sperma, sehingga bisa dihitung sperma hidup dan sperma mati yang telah terwarnai oleh zat pewarna.

Kriteria untuk menentukan sperma yang mati di bawah mikroskopik menurut Soenardjo (1980) adalah sebagai berikut :

- Sperma mati : Kepala sperma berwarna merah, baik pada bagian tepi maupun tengah kepala sperma tersebut, karena sperma mati permeabilitas membrannya mengkerut sehingga akan menyerap warna dari zat warna eosin tersebut.
- Sperma hidup : Kepala sperma tidak berwarna, baik pada bagian tepi maupun tengah.

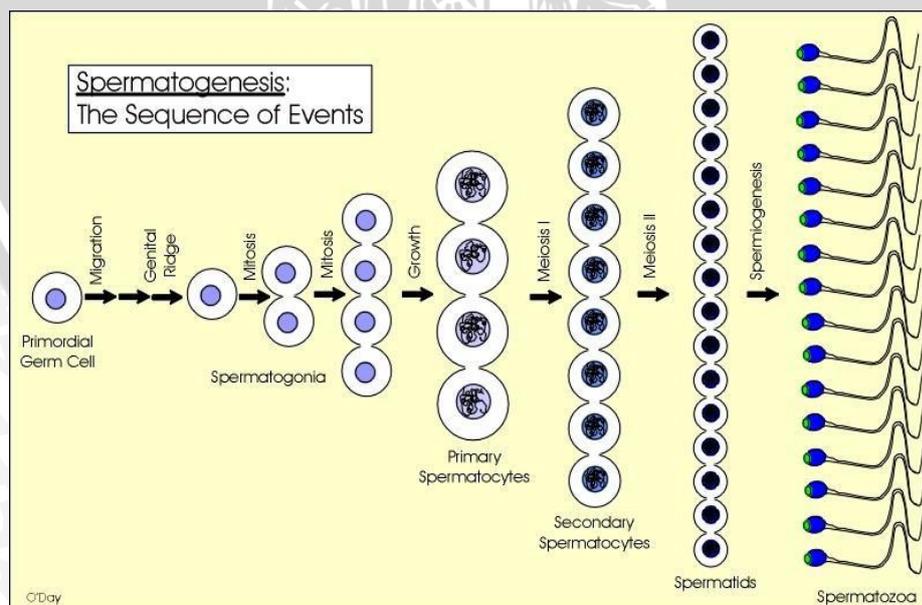
Menurut Bjoerndahl *et al.*, (2003), teknik pewarnaan dengan eosin negrosin sangat mudah dan dapat dipercaya untuk menandai spermatozoa hidup dan mati. Eosin berfungsi sebagai penanda sel-sel mati, sedangkan negrosin memberikan warna pada latar belakang. Sesuai dengan pernyataan Toelihere (1981), perbedaan aktivitas zat warna antara sel-sel sperma yang mati dan yang hidup dapat dipergunakan untuk menghitung secara obyektif jumlah sperma yang terdapat pada waktu semen segar dicampur dengan zat warna, sel-sel sperma yang hidup tidak atau hanya sedikit menyerap warna karena permeabilitas dinding sel mengikat setelah sperma mati. Namun menurut Rieka (2009), sifat dari zat pewarna (Eosin negrosin) dapat bersifat sebagai racun yang dapat meracuni spermatozoa pada konsentrasi yang tinggi.

2.2.4 Spermatogenesis

Spermatogenesis terjadi di testis. Di dalam testes terdapat tubulus seminiferus. Dinding tubulus seminiferus terdiri dari jaringan epitel dan jaringan ikat, pada jaringan epithelium terdapat sel – sel spermatogonia dan sel

sertoli yang berfungsi memberi nutrisi pada spermatozoa. Selain itu pada tubulus seminiferus terdapat pula sel *leydig* yang mengsekresikan *hormone testosterone* yang berperan pada proses spermatogenesis (Anonymous, 2009c).

Testes ikan berbentuk memanjang dalam rongga badan di bawah gelembung renang di atas usus. Jaringan pengikat yang disebut mesenterium (*mesorchium*) menempelkan testes ini pada rongga badan di bagian depan gelembung renang (Sumantadinata 1981). Menurut Richter dan Rustidja (1985) struktur testes terdiri dari rongga-rongga yang tidak teratur dan banyak sekali, terdiri atas *tubula longitudinalis*. Di dalam tubuli terdapat *cyste seminiferis*. Di dalam *cyste-cyste* ini terdapat sel penghasil sperma. Sel-sel penghasil sperma ini dikelilingi oleh sel-sel *sertoli* yang berfungsi *nutritif*. Di luar tubulus terdapat sel-sel *interstitial* yang berfungsi sebagai endokrin. Sel memiliki struktur khusus yang berfungsi untuk memisahkan isi sel dengan lingkungan luarnya, struktur ini dinamakan membrane plasma atau membran sel. Membran plasma ini memiliki ketebalan antara 5 sampai 10 nm, oleh karena itu hanya dapat dilihat dengan mikroskop elektron. Spermatogenesis ikan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Spermatogenesis pada ikan (<http://devcell.bio.uci.edu/LABS/labsv2.htm>)

Perkembangan spermatozoa ikan mas secara umum hampir sama dengan jenis ikan teleost lainnya. Spermatogonia membelah secara mitosis menjadi spermatosit primer. Selanjutnya dengan pembelahan lagi akan terbentuk spermatosit sekunder. Hasil dari pembelahan spermatosit sekunder adalah spermatid. Spermatid ini akan bermetamorfose menjadi gamet yang bergerak aktif, disebut dengan spermatozoa/sel sperma. Proses metamorfose dari spermatid ini sering disebut dengan spermiogenesis (Sumantadinata, 1981). Proses perkembangan spermatozoa (spermatogenesis) dapat ditunjukkan pada Gambar 3.

2.2.5 Larutan Buffer Sperma

Larutan penyangga adalah satu zat yang menahan perubahan pH ketika sejumlah kecil asam atau basa ditambahkan ke dalamnya (Clark, 2007). Fungsi larutan penyangga adalah mempertahankan pH larutan jika ada penambahan sedikit asam kuat / basa kuat / pengenceran (Anonymous, 2010a).

Bila suatu larutan mengandung asam dan basa lemah, larutan tersebut dapat menyerap penambahan sedikit asam / basa kuat. Penambahan asam kuat akan dinetralkan oleh basa lemah, sedangkan penambahan basa kuat akan dinetralkan oleh asam lemah. Larutan seperti ini disebut sebagai larutan penyangga atau larutan buffer (Clark, 2010).

Penyimpanan semen dengan formulasi bahan pengencer yang tepat dapat memperlama kehidupan spermatozoa dibandingkan dengan penyimpanan yang tidak diencerkan (Suyadi dan Isnaini, 2003). Penambahan pengencer pada semen bertujuan untuk memperpanjang daya tahan hidup spermatozoa, melindungi spermatozoa terhadap *coldshock*, menyediakan suatu buffer untuk mencegah perubahan pH akibat pembentukan asam laktat dari hasil metabolisme sperma, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan

elektrolit yang sesuai (Toelihere, 1985). Larutan NaCl fisiologis sering digunakan sebagai bahan pengencer semen yang memberikan sifat buffer dan mampu mempertahankan pH semen dalam suhu kamar (Isnaini, 2000).

2.2.6 Biokimiawi Cairan Seminal

Cairan spermatozoa adalah cairan seminal yang dihasilkan dari dehidrasi testis (Harvey dan Hoar, 1979). Kruger dkk., (1983) menyatakan bahwa cairan spermatozoa ikan mas adalah keputih-putihan dengan kekentalan yang tinggi, mengandung glukosa 5.70 mg/100ml, lipid 90.69 mg/100ml, plasma protein 0.13 mg/100ml, urea 10.75 mg/100ml dan pH 7.53. Menurut Billiard (1995), glukosa yang terdapat di dalam cairan seminal merupakan bahan energetik. Sedangkan menurut Linhart (1991), ion utama dalam cairan seminal adalah K^+ dan Na^+ .

2.3 Sperma Sebagai Media Transfer Gen

Sperma merupakan salah satu gamet yang terlibat langsung dalam proses fertilisasi. Matriks DNA diikat pada daerah *postacrosomal* oleh komponen protein spesifik dan akan bergabung dengan genome induk setelah terjadi fertilisasi (Handarini, 2001).

Menurut Handarini (2004), spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit. Metode sperma sebagai media transfer gen ditemukan oleh Brackett di Amerika Serikat. Penemuan ini menarik minat peneliti dari Italia (Gandolfi *et al.*, 1989) yang mendemonstrasikan sel sperma tikus yang berasal dari epididimis sebagai vektor untuk membawa gen asing ke dalam oosit. Pengikatan gen oleh sperma secara optimal bila sperma dalam keadaan motil dan konsentrasi DNA cukup tinggi.

Gagne *et al.*, (1991) dengan menggunakan elektroporasi menunjukkan DNA asing dapat stabil di dalam sperma dan lebih menguntungkan karena dapat mengurangi trauma akibat mikro injeksi. Hal yang sangat menarik adalah

pengikatan antara sperma dan DNA tidak terjadi secara acak. Dalam beberapa spesies molukel DNA melekat pada satu lokasi dibagian belakang akrosom kepala spermatozoa. Sepertinya terdapat suatu reseptor pada bagian belakang akrosom yang berfungsi sebagai media interaksi antara DNA dengan sel sperma. Cairan spermatozoa diduga menghambat permeabilitas membran sel sperma dengan DNA.

Orban laboratory (Hacket, 1993) mengembangkan elektroporasi pada sperma sebelum fertilisasi dengan menggunakan carp, african catfish dan tilapia (*Oreochromis sp*). Keuntungannya adalah penggunaan sperma relatif lebih mudah dan tiap-tiap ikan menghasilkan jumlah sperma yang motil dalam beberapa jam. Menurut Tsai (2000), ada beberapa keuntungan menggunakan teknik sperma sebagai media transfer gen pada ikan. Diantaranya yaitu : pertama, teknik ini dianggap penghasil "massa" transfer gen. Kedua, teknik ini mengatasi beberapa kerugian yang biasa disebabkan oleh sistem transfer gen pada karakteristik telur, diantaranya yaitu warna telur buram, lengket, mengapung, pronukleus yang tidak tampak dan chorion yang keras. Ketiga, DNA asing dapat ditransfer sampai ke inti sel. Jika telur yang terbuahi dengan sperma yang dielektroporasi dengan DNA asing, fragmen DNA berkesempatan untuk ditransfer ke beberapa tempat selain di blastodisk karena volumenya yang kecil sekali dalam memfertilisasi telur. Keempat, sperma ikan mudah ditangani karena hanya butuh penambahan air secukupnya untuk mengaktifkannya. Kelima, sperma hewan air dapat disimpan dengan bahan cryopreservasi jadi sperma perlakuan selalu siap untuk digunakan.

2.4 Pengaruh Tegangan Elektroporasi dalam Proses Transfer Gen

Tegangan adalah beda potensial antara dua titik yang mempunyai perbedaan jumlah muatan. Tegangan didefinisikan sebagai energi per satuan

muatan listrik. Muatan 1 coulomb akan memerlukan atau melepaskan energi sebesar 1 joule dalam perjalanannya melalui tegangan 1 volt. Kemudian dikatakan juga bahwa tegangan adalah beda potensial di antara dua titik yang dihasilkan oleh 1 joule perpindahan 1 coulomb muatan dari satu titik ke titik lainnya ($1 \text{ volt} = 1 \text{ joule/coulomb}$). Antara titik A dan B yang memiliki perbedaan tegangan dibedakan dengan mengatakan bahwa titik yang memiliki potensial lebih tinggi mempunyai polaritas positif (+) dibandingkan titik lain, sedangkan titik berikutnya dikatakan mempunyai polaritas negatif (-) (Fardana, 2008). Sedangkan menurut Anonymous (2009d), 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.

Tegangan listrik berperan besar dalam kegiatan transfer gen berdasar metode elektroporasi. Transfer gen adalah pemindahan gen dari satu molekul DNA ke molekul DNA lainnya. Menurut Andre *et al.* (2008) kejutan listrik pada jaringan otot memainkan dua peran, yaitu: merubah struktur permeabilitas serabut otot dan elektroporasi membantu perpindahan DNA melewati permeabilitas membran.

Gene pulser atau elektroporator menggunakan suatu rangkaian listrik arus pendek untuk menembus membran sel dan mendorong transgen masuk ke dalam sel (Sarmasik, 2003). *Gene pulser* merupakan suatu alat yang digunakan untuk mentransfer asam nukleat dan dapat digunakan pada varietas yang luas dari berbagai tipe sel utamanya sel mamalia yang sulit untuk ditransfeksi

(Hercules, 2008). Dalam Anonymous (2008e), dijelaskan prosedur elektroporasi adalah sel inang dan molekul yang akan dimasukkan ke dalam sel ditempatkan dalam larutan (cuvet). Gambar Gene pulser disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Gene pulser

Elektroporasi adalah metode pertama yang dikembangkan untuk mengetahui kerja sel di kultur jaringan dan hal ini melibatkan sel sebagai subjek untuk diberi ledakan atau letupan pendek berupa kejutan listrik. Sel sementara akan menyerap molekul lebih banyak dan lebih besar (Chen, 2005). Elektroporasi adalah salah satu teknik yang dapat memasukkan sejumlah molekul DNA ke dalam sel sperma. Elektroporasi menjadikan sel sperma mampu menarik molekul DNA lebih banyak dibandingkan spermatozoa yang tidak dielektroporasi (Lavitrano *et.al*, 2006).

Pemberian kejutan listrik pada saat elektroporasi dapat dilakukan dengan menggunakan metode *exponential* ataupun *square wave*. Menurut (Nakamura, 2009), penggunaan tegangan listrik tinggi pada sampel dengan menggunakan metode *exponential* dapat menyebabkan produksi panas oleh generator yang bisa membunuh sebagian besar sampel yang dielektroporasi. Keuntungan dari penggunaan *square wave generator* adalah meskipun generator menghasilkan gelombang pendek pada tegangan tinggi, generator memproduksi panas rendah sehingga memudahkan dalam mentransfer molekul DNA melewati membran sel

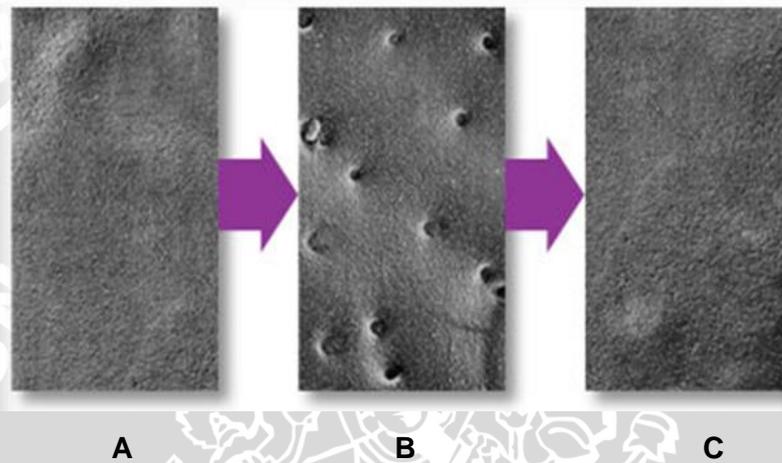
tanpa membunuh sel ataupun embrio. Oleh karena itu lebih banyak peneliti menggunakan metode *square wave generator* untuk mentransfer DNA kedalam sel ataupun embrio.

Medan kejutan listrik dapat digunakan untuk memasukkan DNA ke dalam sel hewan, tumbuhan dan bakteri. Faktor yang mempengaruhi efisiensi dari transfeksi dengan metode elektroporasi adalah penggunaan kejutan listrik yang kuat, lama kejutan listrik, temperatur, penyesuaian DNA, konsentrasi DNA dan komposisi ion di perantara transkripsi (Chen, 2005).

Baru - baru ini metode elektroporasi pada sel sperma ikan dilakukan untuk mempertinggi transfer gen di *common carp*, African catfish, Tilapia dan Chinook salmon, dengan level efisiensi antara 3% sampai 10%. Efektifitas transfer gen dengan metode elektroporasi bergantung pada jumlah listrik yang diberikan dan parameter biologi. Efisiensi DNA sperma chinook salmon yang menggunakan elektroporasi bergantung pada kekuatan medan, jumlah kejutan yang digunakan dan konsentrasi DNA. Efisiensi transfer gen DNA ke dalam embryo dengan elektroporasi sperma bergantung pada kekuatan medan dan lama kejutan (Sin *et al.*, 1993).

Tujuan elektroporasi adalah untuk membantu pengambilan molekul yang berguna seperti vaksin DNA ke dalam sel. Bahan biologis disuntikkan ke dalam atau ditempatkan pada permukaan target jaringan, kejutan listrik dikendalikan dan diarahkan ke jaringan tersebut. Seperti yang terlihat pada Gambar 5, pada saat elektroporasi terjadi kejutan listrik selama beberapa milidetik sehingga untuk sementara membuat peningkatan permeabilitas pori-pori di membran sel. Dalam waktu yang singkat, meninggalkan sel – sel yang rusak. Selama beberapa saat pori – pori ini masih ada sehingga biomolekul dapat masuk dan kemudian terjebak di dalam sel (Anonymous, 2009e). Sedangkan menurut Tsong (1991),

perlakuan elektroporasi harus mempertimbangkan kestabilan dari pori – pori. Kestabilan dari sebuah pori tergantung pada energi pori yang merupakan jumlah dari energi mekanik, penerimaan energi listrik. Energi mekanik merupakan fungsi dari energi akibat ketegangan tepi dan permukaan dari hubungan antara membran dan air.



Gambar 5. Proses Elektroporasi
(<http://nviotechnology.com>)

Keterangan : A. Membran sel sebelum diberi kejutan listrik
B. Membran sel selama diberi kejutan listrik
C. Membran sel setelah diberi kejutan listrik (sel kembali ke keadaan semula)

Penelitian yang dilakukan Sin *et al.*, (1993) tentang motilitas sperma ikan chinhook salmon setelah dielektroporasi, motilitas sperma berkurang dengan bertambahnya medan listrik dan lama kejutan. Bila diberi dua kejutan, masing – masing 27,4 ms pada tegangan listrik 1000V, motilitas sperma mendekati 5%. Kajian efek elektroporasi pada viabilitas sel cenderung berkurang kelangsungan hidupnya seiring dengan bertambahnya kekuatan medan dan lama kejutan.

2.5 GFP sebagai Marker Biologi

Sesuai dengan namanya, GFP (*Green Fluorescent Protein*) merupakan sifat *luminescence* dengan pendaran warna hijau. Pemurnian dan karakterisasi GFP

dari ubur-ubur *Aequorea victoria* dilakukan pertama kali oleh ilmuwan Jepang Osamu Shimomura pada tahun 1960-an. GFP juga bisa digunakan sebagai reporter ekspresi gen, GFP fusion system memiliki keunggulan yaitu tidak memerlukan suatu substrat sehingga deteksinya cukup menggunakan mikroskop. Selain itu GFP juga tidak bersifat toksik sehingga pengambilan gambar bisa menggunakan sel hidup (in vivo imaging). Akhir-akhir ini, GFP digunakan untuk mengetahui ekspresi (localization) suatu gen dengan menggunakan *onion epidermal cells* atau protoplast. Pada umumnya promoter yang dipakai untuk GFP adalah 35S sehingga konstruksi akhir menjadi p35S:gen/cDNA:GFP. Ekspresi yang muncul tersebut sering disebut dengan transient expression dari suatu gen (Anonymous, 2009a).

GFP adalah protein yang mengandung asam amino 238 (26,9 KDa) dari spesies ubur-ubur *Aequorea Victoria* yang bisa berfluoresensi warna hijau dengan adanya penyinaran warna biru (sinar ultraviolet). Protein ini menjadi salah satu sarana yang sangat penting untuk dipergunakan dalam penelitian-penelitian biosains modern. Dengan menggunakan GFP ini maka peneliti bisa mengembangkan cara untuk melacak sintesis protein, menentukan lokasi protein tertentu, atau mengetahui pergerakan protein di dalam sel makhluk hidup (Anonymous, 2009f). Sedangkan 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 oleh modifikasi dari serin, tyrosine dan glisin pada posisi 65-67 dalam rangkaian polypeptida.

Pada ubur-ubur *Aequorea Victoria* (phylum *Cnidaria*, class *Hydrozoa*), perpendarannya dihasilkan akibat dari aktivitas dua photoprotein, yaitu aequorin

dan Green Fluorescent Protein (GFP). Ketika kalsium mengikat ke photoprotein aequorin, sehingga menghasilkan cahaya biru tapi ubur-ubur sebenarnya menghasilkan cahaya hijau. Warna hijau yang berkaitan dengan GFP didapat dari aktivitas energi dari aequorin (Cubitt *et al.*, 1995). Menurut Anonymous (2009a), protein GFP menyerap cahaya biru pada puncak panjang gelombang maksimum 395 nm dan minimum 470 nm serta memancarkan cahaya hijau pada puncak panjang gelombang maksimum 509 nm.

Pemanfaatan GFP menjadi meluas setelah gen-gen yang bertanggung jawab atasnya berhasil ditemukan dan kemudian digunakan secara luas dalam biologi molekular sejak tahun 1990-an berkat kerja dari Martin Chalfie dalam teknik yang dikenal sebagai *reporting system*. Teknik ini melibatkan sejumlah gen dengan karakteristik khas karena menghasilkan substansi yang mudah dilacak mata, sehingga disebut gen pelapor (*reporter genes*) dan bermanfaat sebagai penunjuk secara fisik atas ekspresi suatu gen tertentu pada organisme (Anonymous, 2009f).

Selanjutnya, untuk mengetahui keberadaan GFP hanya memerlukan penyinaran dengan panjang gelombang sinar UV dan juga metode yang tepat dari monitoring ekspresi gen dan lokasi protein di sel hidup (Karunasagar, 1999).

Menurut Gong (2004), sebagai reporter gen untuk studi ikan transgenik pertama kali digunakan pada zebrafish. Embryo zebrafish yang berwarna transparan memungkinkan untuk mengamati ekspresi GFP selama embryogenesis. Dalam perkembangannya GFP dengan promoter dari jaringan ikan medaka selanjutnya diproduksi. Hasilnya, ekspresi GFP memiliki kestabilan pada ikan zebra transgenik. Sesuai dengan pernyataan Higashijima (1997) bahwa zebrafish adalah model organisme yang baik sekali untuk studi perkembangan di vertebrata. Perkembangannagn embryo yang diluar induknya dan

terlihat transparan jadi pengamatan perkembangan embryo dapat dilakukan secara langsung.

2.6 Promoter β -actin

Dalam genetika, 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 sequece 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 *action protein factor* dalam type sel khusus yang akan menguatkan atau menekan transkripsi.

Salah satu hal yang penting dalam kegiatan transgenesis 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 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 bantu 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 ke dalam 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 aktifitas 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, DIC dan konfokal) (Anonymous, 2009h).

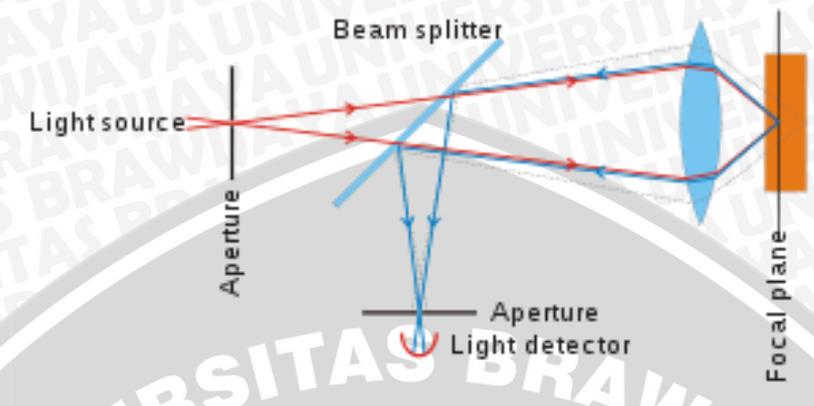
Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM atau LSCM) adalah teknik untuk mendapatkan resolusi tinggi pada gambar optik dengan kedalaman yang

selektif. Keistimewaan *confocal microscopy* adalah kemampuannya untuk mendapatkan gambar yang fokus dari kedalaman yang dipilih, proses tersebut dikenal sebagai *optik sectioning*. Gambar diperoleh secara bertahap (*point by point*) dan kemudian direkonstruksi dengan komputer. Prinsip *confocal microscopy* ini awalnya dipatenkan oleh Marvin Minsky pada tahun 1957, butuh tiga puluh tahun dalam pengembangan laser untuk CLSM sehingga menjadi standar teknik menjelang akhir tahun 1980-an. Pada tahun 1978, Thomas dan Christoph Cremer merancang proses pemindaian laser, mereka memindai permukaan obyek tiga dimensi dengan titik-titik yang menggunakan sinar laser terfokus dan menghasilkan gambar secara elektronik, hasil tersebut serupa dengan hasil dari mikroskop elektron. Desain CSLM ini untuk pertama kalinya menggabungkan metode pemindaian laser dengan deteksi 3 dimensi pada objek biologi dengan penanda yang berpendar. Pada dekade berikutnya, mikroskop *confocal* dikembangkan menjadi teknologi yang benar-benar matang, terutama oleh kelompok-kelompok yang bekerja di Universitas Amsterdam dan Laboratorium Biologi Molekuler Eropa di Heidelberg serta mitra industrinya (Anonymous, 2009i).

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, pengambilan gambar menjadi lebih akurat dan bisa dilakukan pada obyek dalam keadaan utuh, tanpa melalui teknik preparasi. Pengambilan gambar dengan teknik preparasi selama ini, dirasa kurang optimal. Kelebihan lain alat ini adalah bisa dioperasikan untuk sel atau organisme hidup

dan berfluoresensi, dengan hasil berupa foto, grafik dan data secara *realtime* dan per sel (Farid, 2007). Prinsip kerja mikroskop konfokal disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Prinsip kerja mikroskop konfokal
(http://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_laser_scanning_microscopy)

Dalam pemindaian laser mikroskop confocal (Gambar 6) sinar laser melewati sebuah lubang sumber cahaya dan kemudian difokuskan oleh lensa objektif sehingga menjadi kecil pada permukaan spesimen. Khusus aplikasi di bidang biologi, spesimen kemungkinan dapat berpendar. Cahaya laser akan tersebar dan dipantulkan seperti banyak pendaran cahaya kemudian dikumpulkan kembali oleh lensa objektif. *Beam splitter* memisahkan beberapa bagian dari cahaya ke dalam alat deteksi, dimana mikroskop confocal juga 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)) yang mengubah sinyal cahaya menjadi listrik yang kemudian dicatat oleh komputer (Anonymous, 2009i).

Aperture detektor menghalangi cahaya yang tidak berasal dari titik fokus, seperti yang ditunjukkan oleh garis abu-abu titik-titik pada gambar. Cahaya yang keluar ditekan, artinya sebagian besar cahaya kembali diblokir oleh *pinhole* (lubang jarum) yang 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 fluoresence yang bersinar dalam spesimen yang merupakan salah satu gambar yang dihasilkan. Seperti laser scan di atas 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 discan melewati sampel di bidang 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. Data hasil dapat dikumpulkan dari berbagai bidang fokus dari lensa objektif (Anonymous, 2009i).

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).

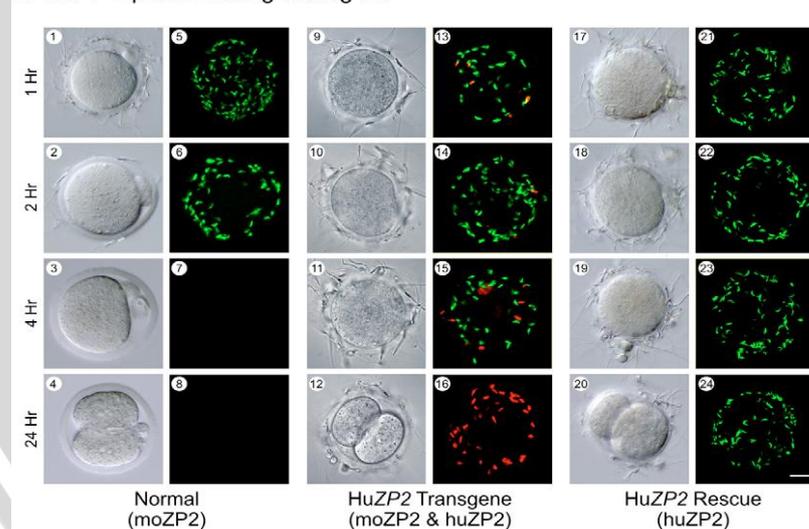
Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) secara luas digunakan dalam berbagai ilmu biologi, antara lain : biologi sel, genetika, mikrobiologi dan pengembangan biologi (Anonymous, 2009i).

Berbeda dengan mikroskop konfokal, keuntungan menggunakan mikroskop inverted yaitu bisa digunakan untuk mempelajari sel-sel hidup, jaringan dan organisme parasit. Tetapi pada mikroskop inverted ini memiliki beberapa kerugian yaitu pembesaran maksimum yang tersedia pada mikroskop inverted

umumnya lebih terbatas, yaitu pada pembesaran 40x (pembesaran 60x hanya tersedia pada model yang lebih mahal). Lensa dari mikroskop inverted terletak di bawah pada bagian yang transparan dengan sumber cahaya yang menerangi spesimen dari atas. Spesimen ini diletakkan diatas permukaan lensa objektif dengan garis pandang mengarah ke objek (Anonymous, 2011).

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 menurut aturan protokol. Sampel difiksasi dengan 2% paraformaldehyde dan diwarnai dengan pewarna Hoechst sebelum pencitraan (Baibakov *et al.*, 2007). Gambar dari ekspresi akrosom sperma yang diamati di bawah mikroskop konfokal disajikan pada Gambar 7.

A. EGFP-Sperm Binding During IVF



Gambar 7. Sel sperma mengikat huZP2 pada embrio tikus setelah fertilisasi (Baibakov, 2007)

2.8 Propidium Iodide

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. Dalam pewarnaan dengan PI, pertama-tama sel harus difiksasi terlebih dahulu (Wink,2002).

Menurut Anonymous (2009j), Propidium Iodide (PI) adalah molekul yang berpendar dengan memiliki berat molekul 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 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 mengindikasikan lokasi 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, 2010b).

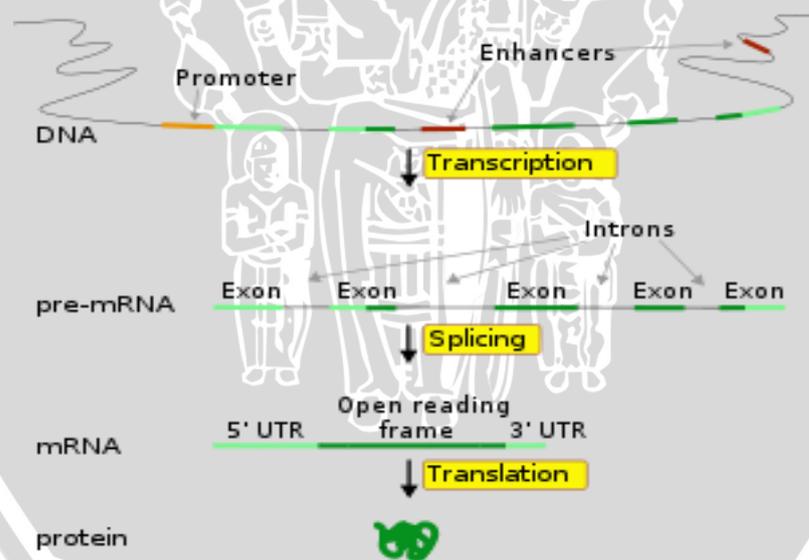
Garner dan Lawrence (1995) menemukan bahwa kombinasi bahan pewarna DNA yaitu SYBR14 dan Propidium Iodide (PI) dapat digunakan untuk memperkirakan perbandingan sperma hidup dan mati pada sampel perlakuan sperma segar dan yang diawetkan. Sperma non motil dan sperma yang terlihat mati berpendar ketika diwarnai 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) atau oranye.

2.9 Ekspresi Gen

Ekspresi gen adalah proses penentuan sifat dari suatu organisme oleh gen. Suatu sifat yang dipunyai 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). Proses ekspresi gen disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Proses ekspresi gen
(http://id.wikipedia.org/wiki/Ekspresi_gen)

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 cetakannya. 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 dirangkaikan dengan asam amino lainnya untuk membentuk rantai polipeptida atau protein. Jenis asam amino yang dirangkaikan ditentukan oleh urutan nukleotida yang terdapat pada molekul mRNA. Jadi, mRNA digunakan sebagai model cetakan bagi sintesis protein. Asam amino dirangkaikan 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).

3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Satu set alat Gene Pulser Xcell™ merk BIO-RAD, mikroskop konfokal (CLSM) merk Olympus fluoview versi 1.7a, mikroskop Olympus BX 51 tipe DIC, mikroskop Binokuler merk Olympus CX21, kamera digital, bak pemeliharaan induk ikan mas, timbangan digital "Meter Pe 22", timbangan digital "AND EK 610i", penggaris, cawan petri, mangkuk plastik, spuit 5ml, objek glass, cover glass, cover slip 15mmx15mm, akuarium, bak plastik, serbet, seser, botol film, nampan, mikro pipet, yellow dan white tip, pipet tetes, pH meter, DO meter, termometer, handtally counter, haemocytometer dan instalasi aerasi. Gambaran alat-alat yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 1.

3.1.2 Bahan

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Induk ikan mas (*Cyprinus carpio*), ovaprim, larutan fisiologis, eosin negrosin, tissue, kapas, alkohol 70%, aquadest, sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*), air aerasi, ciste artemia, es batu, formalin 0,4 %, propidium Iodide (PI), larutan PBS, gliserin, cat kuku, aluminium foil. Gambaran bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 1.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Soelistyowati (2003), metode eksperimen adalah mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil tersebut akan menjelaskan hubungan kausal antara variabel-variabel yang diteliti. Untuk membuat suatu percobaan

yang valid (dapat dipertanggungjawabkan) maka dibutuhkan "Rancangan Percobaan atau Desain Eksperimen". Rancangan percobaan merupakan langkah-langkah lengkap yang perlu diambil jauh sebelum eksperimen dilakukan supaya data yang semestinya diperlukan dapat diperoleh sehingga akan membawa kepada analisis obyektif dan kesimpulan yang berlaku untuk persoalan (permasalahan) yang dibahas. Sedangkan menurut Anonymous (2009), Penelitian ilmiah adalah suatu proses, yaitu suatu rangkaian langkah-langkah yang dilakukan secara terencana dan sistematis guna mendapat pemecahan masalah atau mendapatkan jawaban terhadap pertanyaan-pertanyaan tertentu. Langkah-langkah yang dilakukan itu harus serasi dan saling mendukung satu sama lain, agar penelitian yang dilakukan mempunyai bobot yang cukup memadai dan memberikan kesimpulan-kesimpulan yang tidak meragukan.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Rancangan faktorial adalah rancangan dimana semua (hampir semua) taraf sebuah faktor dikombinasikan dengan semua (hampir semua) taraf tiap faktor lainnya yang terdapat dalam eksperimen tersebut (Soelistyowati, 2003). Sedangkan menurut Yitnosumarto (1993), percobaan yang menggunakan lebih dari satu faktor dengan perlakuan yang merupakan kombinasi dari level-level faktor yang lain disebut percobaan faktorial.

Model umum untuk metode RAL Faktorial yaitu :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana : Y_{ijk} = nilai atau hasil pengamatan untuk faktor level ke- i , level ke- j dan pada ulangan ke- k

- μ = nilai rata-rata (tengah umum)
 α_j = pengaruh perlakuan level ke- j (faktor perlakuan pertama)
 β_j = pengaruh perlakuan level ke- j (faktor perlakuan lainnya)
 $(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh interaksi faktor I dan II
 ε_{ijk} = galat / 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 kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L, sehingga masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut :

- A1B1 → diberikan kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L dengan Pulse Length 0,5 ms + pulse number 2x
- A1B2 → diberikan kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L dengan Pulse Length 0,5 ms + pulse number 4x
- A1B3 → diberikan kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L dengan Pulse Length 0,5 ms + pulse number 6x
- A2B1 → diberikan kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L dengan Pulse Length 1 ms + pulse number 2x

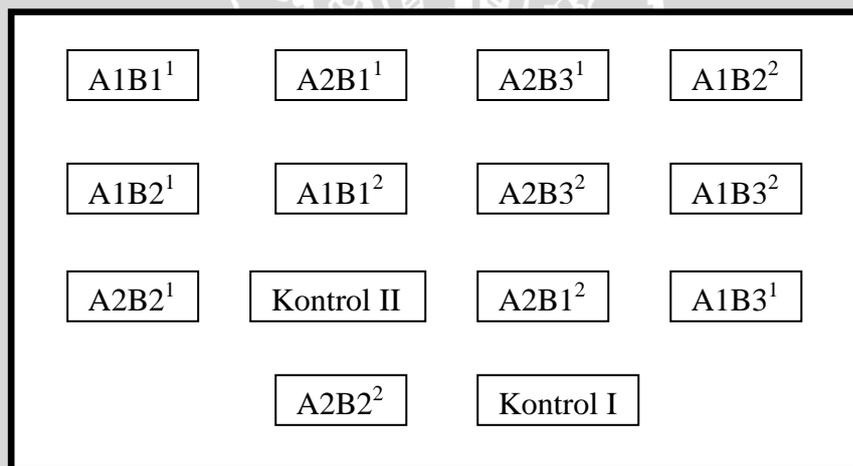
A2B2 → diberikan kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/μL dengan Pulse Length 1 ms + pulse number 4x

A2B3 → diberikan kejutan listrik 40 Volt dan konsentrasi GFP 60 ng/μL dengan 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 9 di bawah ini :



Gambar 9. Denah penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

Sebelum melaksanakan penelitian persiapan yang dilakukan, antara lain :

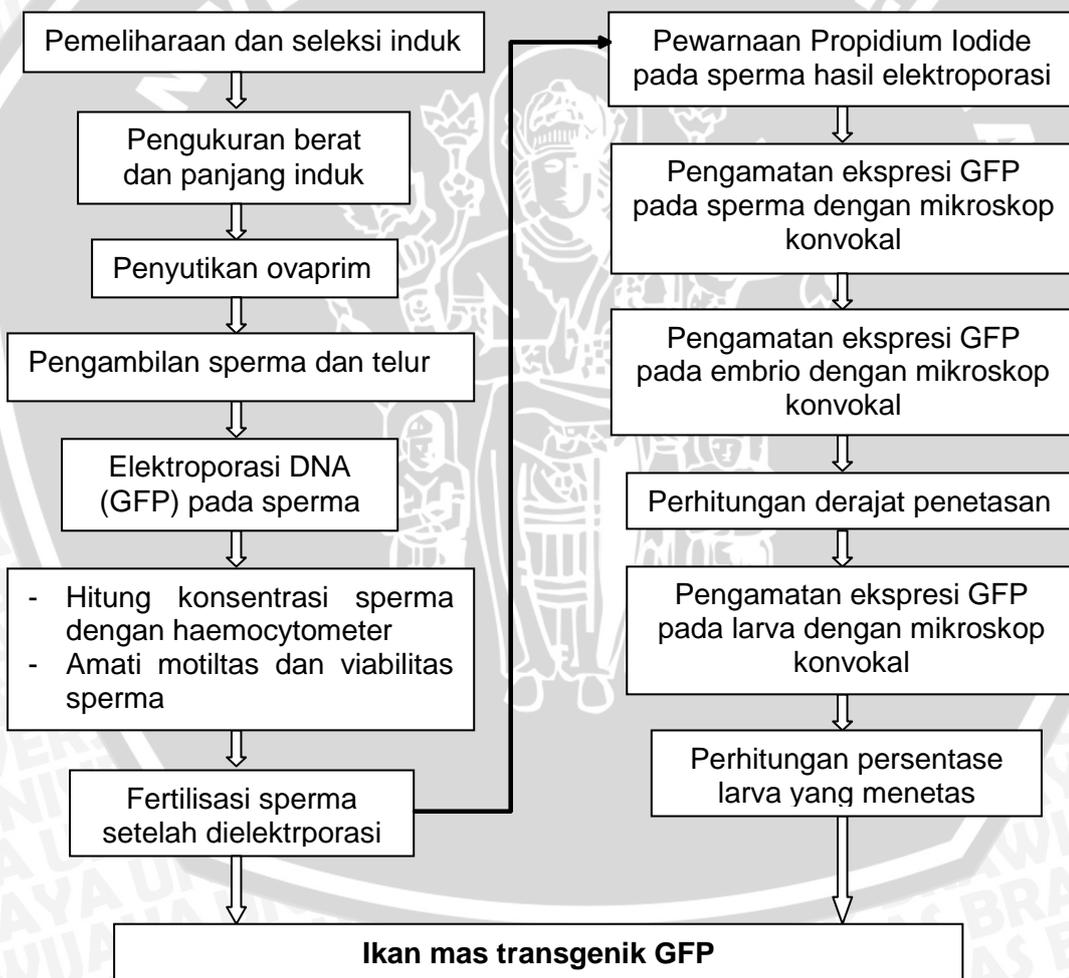
- ✓ Pemeliharaan ikan mas (*Cyprinus carpio*) di bak beton yaitu dengan memberikan pakan pellet dan pakan alami yang banyak mengandung

protein sehingga mempercepat matang gonad serta pergantian air secara rutin jika terlihat airnya kotor

- ✓ Dilakukan kateter terhadap telur ikan untuk menunjukkan telur yang telah matang dan siap untuk difertilisasikan
- ✓ Persiapan alat dan bahan untuk keperluan penelitian serta persiapan wadah yang telah dipasang instalasi aerasi sebagai tempat telur yang difertilisasikan

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

Langkah-langkah Pelaksanaan Penelitian



❖ Seleksi Induk Jantan dan Betina Matang Gonad

Memilih induk yang baik merupakan salah satu cara meningkatkan produksi benih. Sebelum dilakukannya penelitian, kita harus menyeleksi induk jantan dan

betina yang matang gonad agar didapatkan induk yang berkualitas. Ciri untuk induk betina adalah gerakannya lamban dan jika gonad telah matang, perut membulat lunak, genital papilla mengembang dan berwarna kemerahan, lubang anus melebar dan menonjol. Sedangkan untuk induk jantan yaitu gerakannya lincah dan jika testis telah matang maka akan mengeluarkan sperma putih bila perut diurut perlahan.

❖ Pengukuran Berat dan Panjang induk

Pengukuran berat dan panjang ikan perlu dilakukan karena untuk mengetahui apakah ikan mas tersebut sudah memenuhi kriteria sebagai induk.

❖ Penyuntikan Ovaprim

Ovraprim biasanya dibuat dari campuran ekstra kelenjar hipofisa dan hormon mamalia. Ovaprim digunakan sebagai agen perangsang bagi ikan untuk memijah, kandungan sGnRHa akan menstimulus pituitari untuk mensekresikan GtH I dan GtH II. Sedangkan anti dopamin menghambat hipotalamus dalam mensekresi dopamin yang memerintahkan pituitari menghentikan sekresi GtH I dan GtH II. Kegunaan Ovaprim antara lain : menekan musim pemijahan, mengatur kematangan gonad selama musim pemijahan normal, merangsang produksi sperma pada jantan untuk periode waktu yang lama dan volume yang lebih banyak dan merangsang pematangan gonad sebelum musim pemijahan (Mukhlas, 2009).

Dosis ovaprim yang diberikan mempengaruhi waktu memijah dari ikan yang bersangkutan. Berdasarkan penelitian Assubuki (2002) dapat disarankan penggunaan hormon ovaprim yang optimum untuk pemijahan ikan lele dumbo adalah 0,3 ml/kg. Jadi dosis yang bisa digunakan untuk disuntikkan ke induk ikan mas yaitu 0,3 ml/kg karena dosis tersebut sudah mencukupi untuk meningkatkan kematangan gonad.

Penyuntikan ovaprim dilakukan pada bagian intramuscular dengan kemiringan jarum suntik 45° . Setelah jarum dimasukkan, kemudian jarum ditarik sedikit dan ovaprim disuntikkan pada sisi kanan dan kiri tubuh ikan mas. 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). 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).

❖ Pengambilan Sperma dan Telur

Pengambilan sperma dilakukan dengan cara mengambil induk jantan yang telah matang gonad dari bak induk secara hati-hati kemudian dibungkus dengan lap halus pada bagian punggung, dipegang secara terlentang dengan lubang genital menghadap ke atas. Sperma dikeluarkan dengan cara mengurut secara halus pada bagian perut ikan, yaitu dimulai dari bawah linea lateralis (di atas sirip perut) ke arah lubang genital. Sperma yang telah keluar dihisap dengan spuit plastik 3 ml kemudian dibungkus dengan tisu atau aluminium foil agar tidak terkena matahari secara langsung.

Sedangkan untuk pengambilan telur dilakukan setelah selang waktu 12 jam dari awal penyuntikan ovaprim. Caranya yaitu dengan mengurut perut sampai ke arah lubang genital sampai telur keluar. Telur yang telah keluar ditampung dengan mangkuk plastik dan ditutup dengan serbet setengah basah agar telur tidak cepat kering. Kemudian ditimbang seluruh berat telur yang didapat, setelah itu telur-telur tersebut ditimbang sebanyak 0,5 gram dengan timbangan digital yang diletakkan pada cawan petri.

❖ Elektroporasi sperma dan GFP

Perlakuan elektroporasi pada penelitian ini menggunakan satu set alat Gene Pulser Xcell™ merk BIO-RAD yang terdiri atas mesin elektroporator, shock pod dan kuvet.

Tahapan pelaksanaan elektroporasi sperma dan GFP sebagai berikut :

- Disambungkan steker alat ke sumber listrik
- Ditekan tombol power di samping kanan alat untuk menyalakan elektroporator maka muncullah 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 no.4
- Diberikan nama dan entry data tegangan, jumlah tegangan dan lama tegangan
- Dimasukkan sperma yang telah diencerkan dengan Nafis perbandingan 1:1 sejumlah 25 μL dan GFP 8 μL ke dalam kuvet
- Ditutup kuvet dan dilap dengan tissue
- Dimasukkan kuvet ke dalam shock pod
- Tekan tombol pulse untuk menjalankan gene pulser
- Muncul hasil dengan tampilan sesuai dengan parameter yang dipilih
- Diambil kuvet yang telah dielektroporasi kemudian ditambahkan bahan pengencer (Nafis) sebanyak 267 μL untuk mempermudah pengambilan sperma di dalam kuvet
- Diambil sperma dalam kuvet seluruhnya dengan menggunakan mikropipet kemudian dipindahkan ke appendof
- Diambil 100 μL untuk difertilisasikan dengan telur, 5 μL untuk diamati motilitas sperma dan 5 μL untuk diwarnai dengan eosin negrosin untuk mengetahui viabilitas sperma. Sisanya digunakan untuk pengamatan integrasi gen GFP dengan menggunakan mikroskop konvokal

❖ Pengamatan motilitas dan mortalitas sperma

Motilitas sperma yaitu pergerakan sperma. Pengamatan motilitas sperma dilakukan dengan cara mengambil sperma sebanyak 5 μ l kemudian ditetaskan pada objek glass lalu ditetesi air dan ditutup dengan *cover glass*. Setelah itu diamati pergerakan sperma di mikroskop. Menurut Handarini (2004), Pengamatan motilitas sperma pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung persentase motilitas sperma dalam satu bidang pandang lensa mikroskop.

Sedangkan mortalitas sperma yaitu tingkat kematian dari sperma tersebut. Pengamatan mortalitas sperma dilakukan dengan cara meneteskan sperma sebanyak 5 μ l di *objek glass* kemudian diberi pewarna eosin negrosin dan *dismear* dengan *cover glass*, setelah kering diamati di bawah mikroskop dan dihitung persentase mortalitas sperma dengan cara menghitung jumlah sperma yang mati (berwarna merah) dan jumlah total sperma yang diamati dengan menggunakan *handtally counter*. Persentase mortalitas sperma dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\sum \text{spermamati}}{\sum \text{total sperma}} \times 100\% \quad (\text{Toelihere, 1997})$$

❖ Fertilisasi sperma setelah dielektroporasi

Setelah sperma dielektroporasi kemudian diambil sebanyak 100 μ l untuk difertilisasikan dengan telur. Tahapan fertilisasi yaitu mencampurkan sperma transgen dengan 0,25 gram telur dengan jumlah \pm 185 butir. Setelah telur dan sperma tercampur kemudian diberi air aerasi secukupnya (untuk mengaktifkan sperma) dan diaduk secara perlahan. Perhitungan fertilitas dapat dilakukan 3 sampai 24 jam setelah fertilisasi. Setelah itu dihitung derajat fertilisasi dengan rumus :

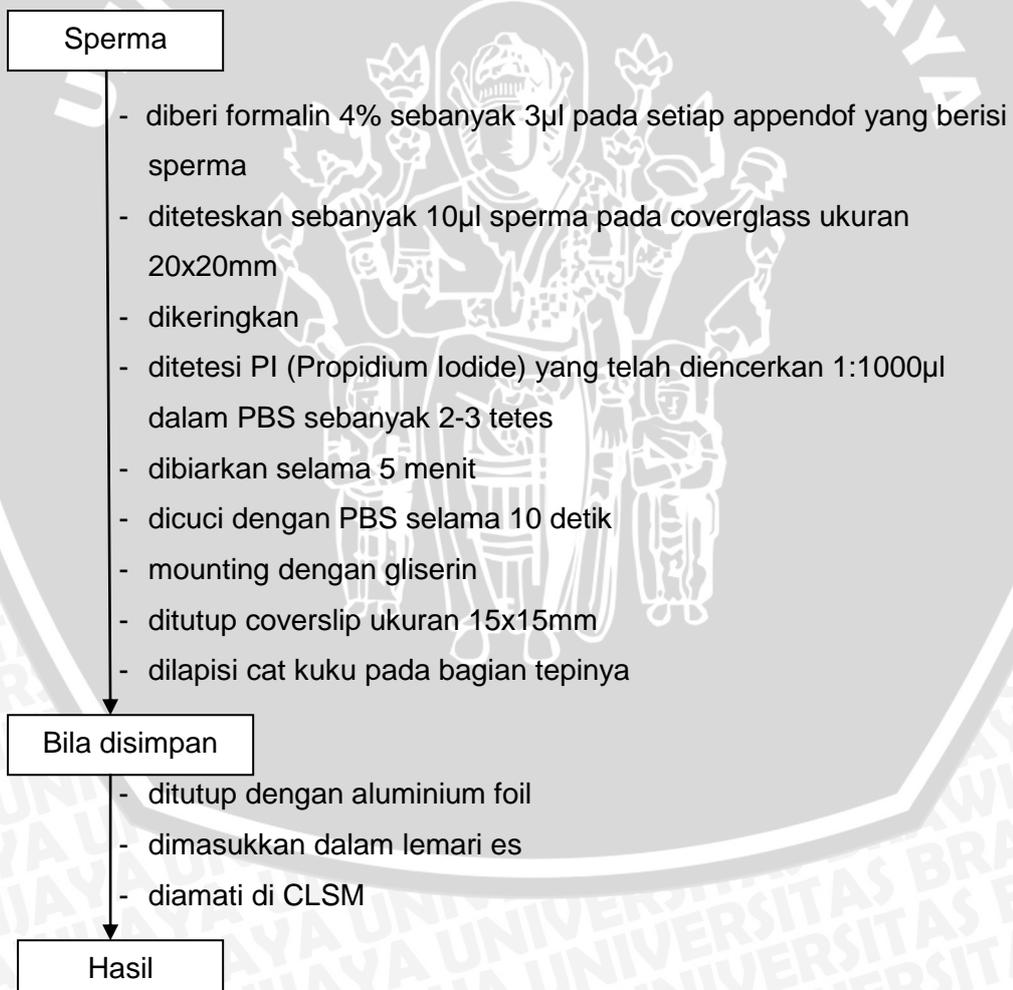
$$\% \text{ Derajat Fertilisasi} = \frac{\sum \text{telur terbuahi}}{\sum \text{telur total}} \times 100\% \quad (\text{Rustidja, 2000})$$

❖ Perhitungan konsentrasi sperma dengan haemocytometer

Perhitungan konsentrasi sperma dengan haemocytometer dilakukan dengan pengenceran 1000x. tahapannya yaitu diambil sperma sebanyak 10 μ l kemudian diencerkan dengan Nafis sebanyak 990 μ l. Setelah tercampur diambil secukupnya dan ditetaskan di *haemocytometer*. Dihitung jumlah sperma pada kotak kiri atas, kanan atas, tengah, kiri bawah dan kanan bawah pada *haemocytometer*.

❖ Pewarnaan Propidium Iodide pada sperma hasil elektroporasi

Tahapan pewarnaan inti sperma dengan Propidium Iodide adalah sebagai berikut :



- ❖ Pengamatan ekspresi GFP pada sperma dengan mikroskop konfokal

Hasil sperma yang telah diberi pewarna PI (Propidium Iodide) diamati ekspresinya di bawah mikroskop konfokal. Tujuan dari pewarnaan PI yaitu untuk mengetahui apakah gen GFP tersebut masuk pada inti sperma atau cytoplasma saja, karena berpengaruh pada larva hasil fertilisasi. Sperma yang terintegrasi GFP akan berwarna hijau. Kemudian dihitung persentase sperma yang terintegrasi GFP dan diamati pula letak integrasi gen GFP serta nilai intensitasnya.

- ❖ Pengamatan ekspresi GFP pada embrio dengan mikroskop konfokal

Embrio juga perlu diamati di bawah mikroskop konfokal, dengan tujuan untuk mengetahui apakah telur tersebut terfertilisasi dengan sperma transgen atau tidak. Caranya yaitu mengambil telur yang terfertilisasi (umur 20 jam) sebanyak 3 butir lalu dicampur dengan gliserin secukupnya di appendoff, agar sel-sel telur tidak rusak pada saat disimpan di freezer. Kemudian dihitung persentase embrio yang membawa dan tidak membawa GFP selanjutnya dibandingkan dengan telur kontrol (tanpa perlakuan).

- ❖ Perhitungan derajat penetasan

Setelah telur menetas, dapat dihitung daya tetas telur tersebut untuk mengetahui jumlah larva normal. Rumus untuk menghitung daya tetas telur adalah sebagai berikut :

$$\text{Daya tetas telur} = \frac{\sum \text{larva normal}}{\sum \text{total larva} + \text{telur yang tidak menetas}} \quad (\text{Rustidja, 2000})$$

- ❖ Pengamatan ekspresi GFP pada larva dengan mikroskop konfokal

Pengamatan ekspresi GFP pada larva perlu dilakukan, karena untuk mengetahui apakah gen GFP masih terekspresi pada larva atau tidak. Pengamatan larva transgen dilakukan pada larva umur 8 dan 50 jam. Diambil 2-3 larva kemudian dicampur dengan gliserin secukupnya di appendoff, agar sel-sel

larva tidak rusak pada saat disimpan di freezer. Pengamatannya menggunakan mikroskop konfokal, kemudian diamati pula letak integrasi dan nilai intensitasnya pada larva.

3.5 Parameter Penelitian

3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama pada penelitian ini antara lain :

- Ekspresi gen *Green Fluorescent Protein* (GFP) pada sperma
- Ekspresi gen *Green Fluorescent Protein* (GFP) pada embrio dan larva

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini antara lain :

- Nilai motilitas, mortalitas dan derajat fertilitas sperma
- Nilai daya tetas telur

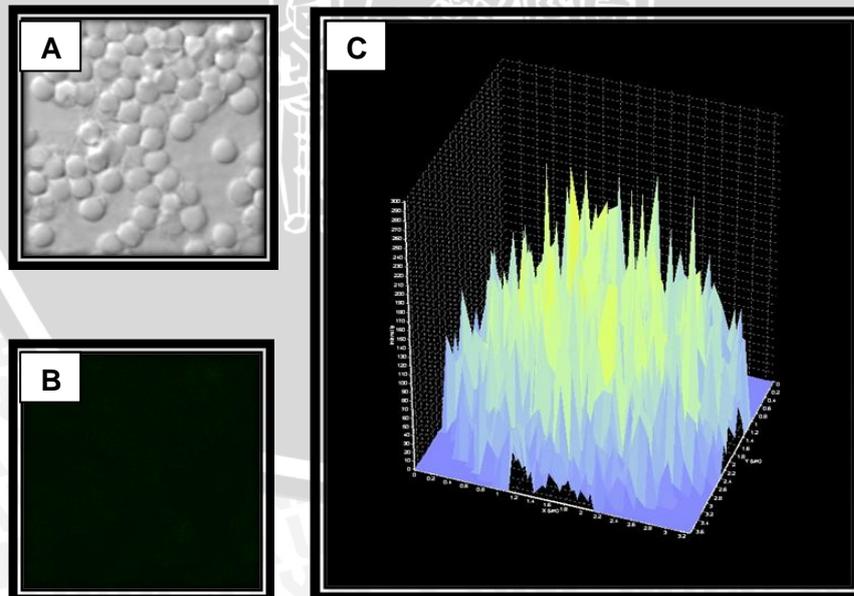


4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekspresi gen GFP

a. Ekspresi gen GFP pada Sperma

Sperma yang tersisipi gen GFP akan berpendar dan berwarna hijau, hal itu karena GFP menyerap gelombang laser dari mikroskop konvokal kemudian akan memendarkannya dengan panjang gelombang tertentu yang ditangkap oleh kamera mikroskop konvokal. Hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop konvokal, menunjukkan bahwa pada sperma kontrol tidak tampak pendaran GFP pada tampilan layar fluorescent, hasil analisa intensitas pendaran GFP nya 200 *arbitrary*. Hasil analisa sperma kontrol disajikan pada Gambar 10. Diketahui bahwa pendaran tersebut adalah *autoflorescent* yang dimiliki oleh sperma. Menurut (Anonymous, 2009), *autofluorescent* adalah pendaran alami (biasanya terlihat pada kultur jaringan hidup), sebagian besar terdiri atas *flavins* dan *porphyrins* serta pada tumbuhan yaitu klorofil.



Gambar 10. Ekspresi sperma kontrol dengan perbesaran 2400x

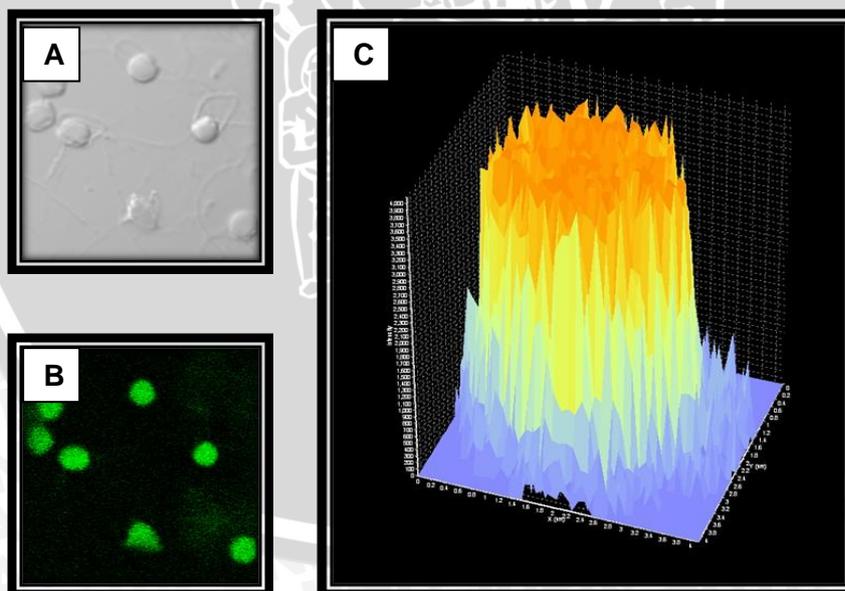
A. tampilan sperma pada layar DIC

B. tampilan sperma pada layar fluorescent

C. intensitas sperma kontrol

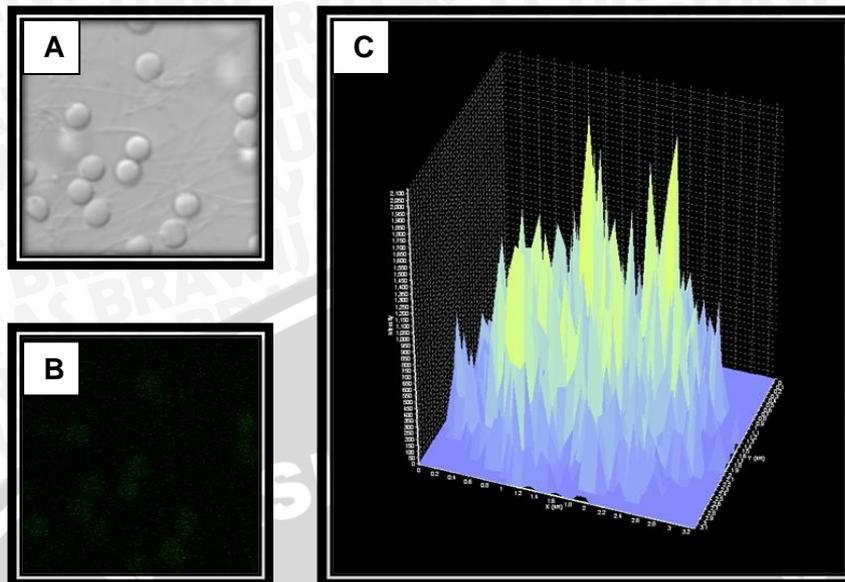
Pada sperma perlakuan menunjukkan bahwa semua sperma mengekspresikan gen GFP. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya pendaran Gambar pendaran GFP pada sperma secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 7.

Dari hasil pengamatan pendaran GFP pada sperma dengan menggunakan mikroskop konfokal menunjukkan bahwa pendaran teringgi pada perlakuan 0,5 ms 4x dengan nilai intensitasnya 3600 *arbitrary*, seperti yang disajikan pada Gambar 11. Sedangkan pendaran GFP terendah pada perlakuan 0,5 ms 6x dengan nilai intensitas 1750 *arbitrary*, seperti yang disajikan pada Gambar 12. Nilai intensitas sperma selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 8. Sperma merupakan salah satu gamet yang terlibat langsung dalam proses fertilisasi. Matriks DNA diikat pada daerah *postacrosomal* oleh komponen protein spesifik dan akan bergabung dengan genome induk setelah terjadi fertilisasi (Handarini, 2001).



Gambar 11. Ekspresi sperma perlakuan 0,5 ms 4x dengan perbesaran 2400x

- A. tampilan sperma pada layar DIC
- B. tampilan sperma pada layar fluorescent
- C. intensitas sperma perlakuan



Gambar 12. Ekspresi sperma perlakuan 0,5 ms 6x dengan perbesaran 2400x
A. tampilan sperma pada layar DIC
B. tampilan sperma pada layar fluorescent
C. intensitas sperma perlakuan

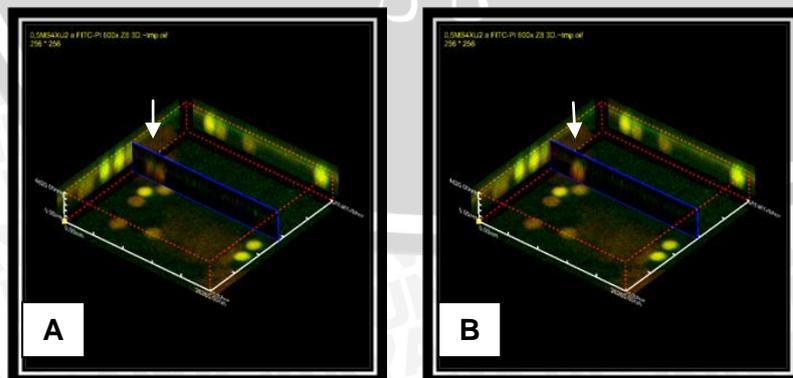
Spermatozoa dari hampir semua spesies hewan memiliki kemampuan secara spontan untuk mengambil molekul DNA eksogen dan mampu untuk mengantarnya ke oosit pada waktu fertilisasi. Hal ini telah dimanfaatkan untuk menghasilkan hewan rekayasa genetika (transgenik) yang lebih efisien (Smith, 2005). Elektroporasi merupakan metode yang efisien untuk menghantarkan molekul asing ke dalam sel. Dorongan listrik menyebabkan membran sel sementara bersifat permeabel untuk menyerap DNA dan makromolekul lainnya (Sharma *et al.*, 2005). Elektroporasi menjadikan sel sperma mampu menarik molekul DNA lebih banyak dibandingkan spermatozoa yang tidak dielektroporasi (Lavitrano *et.al*, 2006).

Selain melakukan analisa intensitas, dilakukan juga analisa tingkat ekspresi gen GFP pada sperma dengan menggunakan pewarna inti sel *Propidium Iodide* (PI). Hal ini dilakukan karena *Propidium Iodide* (PI) untuk mewarnai nukleus, sehingga bisa diketahui sampai batas mana gen GFP mampu terintegrasi pada

sel sperma. Hasil pengamatan integrasi gen GFP secara keseluruhan dapat dilihat pada Lampiran 9.

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) (Anonymous, 2009j). 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).

Dilihat dari hasil pengamatan intensitas gen GFP menunjukkan bahwa perlakuan lama kejutan 0,5 ms dengan jumlah kejutan yang berbeda (2x, 4x, 6x) sebagian besar gen GFP terintegrasi pada sitoplasma dan inti sel dengan pendaran hijau dari GFP dan merah *Propidium Iodide* pada slicing (pemotongan) di bagian tepi maupun tengah dari sel sperma, seperti yang disajikan pada Gambar 13. Hasil pengamatan daerah integrasi GFP pada sperma selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 9.



Gambar 13. Integrasi GFP pada sperma perlakuan 0,5 ms 4x
A. slicing pada bagian tepi sel sperma
B. slicing pada bagian tengah sperma

Setelah dilakukan perhitungan persentase GFP yang terintegrasi pada inti sel sperma, diperoleh rata-rata hasil integrasi gen GFP dalam sperma tertinggi pada perlakuan lama kejutan 0,5 ms dengan jumlah kejutan 4x sebesar 61,9% (Lampiran 2), kemudian dihitung persentase integrasi gen GFP pada inti sperma paling rendah terdapat pada perlakuan 0,5ms 6x dan 1ms 4x dengan nilai 0% sedangkan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan 0,5ms 4x. Persentase integrasi GFP pada inti sperma secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Integrasi GFP pada inti sperma

Perlakuan	Terintegrasi pada inti	Terintegrasi pada sitoplasma	Total sperma yang diamati	% sperma yang terintegrasi GFP pada inti	Rata-rata
0,5 ms 2x ¹	8	20	28	28,5%	33,89%
0,5 ms 2x ²	11	18	28	39,28%	
0,5 ms 4x ¹	8	4	12	66,67%	61,9%
0,5 ms 4x ²	4	3	7	57,14%	
0,5 ms 6x ¹	-	9	9	0%	0%
0,5 ms 6x ²	-	16	16	0%	
1 ms 2x ¹	-	8	8	0%	33,3%
1 ms 2x ²	5	10	15	33,3%	
1 ms 4x ¹	-	6	6	0%	0%
1 ms 4x ²	-	4	4	0%	
1 ms 6x ¹	-	9	9	0%	25%
1 ms 6x ²	5	15	20	25%	

Dari Tabel 1 diketahui bahwa perlakuan yang efektif untuk mengekspresikan GFP sampai ke inti sperma adalah 0,5 ms 4x, dilihat dari nilai persentasenya yang paling tinggi yang ditunjukkan dengan fluoresensi yang berwarna orange karena ada kombinasi dengan warna GFP (hijau) dengan warna *Propidium iodide* (merah).

Untuk mengetahui pengaruh pemberian lama kejutan dan jumlah kejutan yang berbeda terhadap integrasi GFP pada inti sperma, maka dilakukan analisa sidik ragam (Lampiran 2) yang disajikan pada Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Hasil sidik ragam integrasi GFP pada inti sperma ikan mas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan Kombinasi	5	5628,87	-	-	-	-
a. <i>Pulse Length</i>	1	1484,68	1484,68	9,17*	5,99	13,75
b. <i>Pulse Number</i>	2	1343,18	671,59	4,15 ^{ns}	5,14	10,92
c. Interaksi PL dan PN	2	2801,01	1400,5	8,65*	5,14	10,92
2. Acak	6	970,45	161,74	-	-	-
3. TOTAL	11	6599,32	-	-	-	-

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 ** = berbeda sangat nyata
 * = berbeda nyata

Hasil sidik ragam integrasi GFP pada inti sperma, menunjukkan bahwa perlakuan dengan lama kejutan (*Pulse length*) serta interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap daya integrasi GFP pada inti sperma yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Sedangkan perlakuan *Pulse number* tidak berpengaruh nyata terhadap daya integrasi GFP pada inti sperma dimana $F_{hitung} < F_{tabel 5\%}$ yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1 .

Selanjutnya dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui pengaruh pemberian lama kejutan (*Pulse length*) (Lampiran 2) seperti yang tersaji pada Tabel 3.

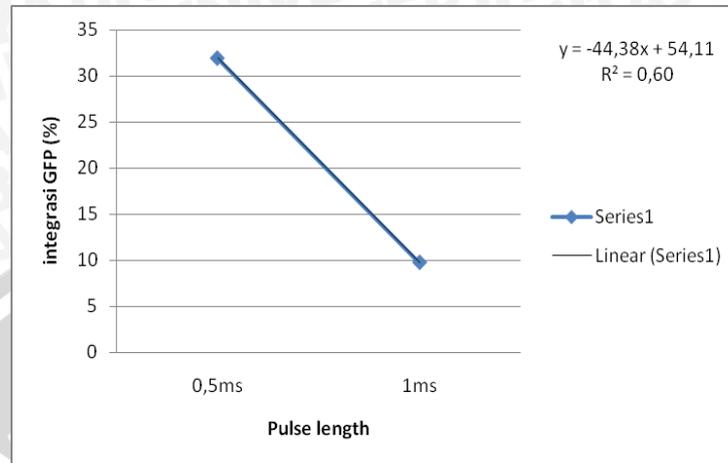
Tabel 3. BNT (Beda Nyata Terkecil) *Pulse Length* terhadap integrasi GFP pada inti sperma

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
0,5 ms	31,93	a
1 ms	9,71	b

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Dari Tabel 3 dapat diketahui bahwa perlakuan pemberian lama kejutan (*Pulse length*) 0,5 ms lebih baik bila dibandingkan dengan 1 ms. Kemudian didapatkan persamaan regresi linier, yaitu $y = 54,11 - 44,38x$ yang merupakan bentuk hubungan antara lama kejutan (*Pulse length*) dan integrasi GFP pada inti

sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*), seperti yang ditampilkan Gambar 14 berikut ini.



Gambar 14. Grafik hubungan antara *Pulse length* dan integrasi GFP pada inti sperma

Pada Gambar 14 dapat dilihat bahwa nilai integrasi GFP pada inti sperma semakin menurun dengan penambahan lama kejutan. Dapat disimpulkan perlakuan lama kejutan (*Pulse length*) 0,5ms memberikan nilai lebih tinggi daripada pemberian lama kejutan 1ms. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan lama kejutan yang rendah lebih efektif digunakan dalam elektroporasi sperma. Rols dan Justin (1998) menyebutkan bahwa lama kejutan merupakan faktor yang sangat penting untuk kesuksesan transfeksi. Hal ini terutama tergantung pada diameter sel. Ukuran sel yang lebih besar maka dibutuhkan kejutan yang lebih lama untuk penyebaran dari selaput tersebut. Pada pengukuran sel sperma diperoleh diameter sel sebesar 2,7 μm (Lampiran 15). Dengan sel yang berukuran sangat kecil tersebut maka relevan jika hanya membutuhkan *pulse length* yang lebih pendek.

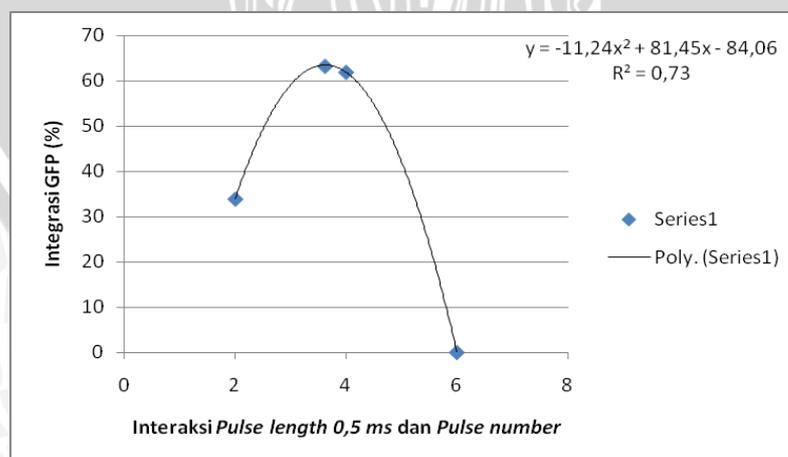
Kemudian dilakukan uji BNT interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* (Lampiran 2) seperti yang terlihat pada Tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Uji BNT Interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* terhadap integrasi GFP pada inti sperma

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
0,5 ms 6x dan 1 ms 4x	0	a
1 ms 6x	12,5	a
1 ms 2x	16,5	a
0,5 ms 2x	33,89	ab
0,5 ms 4x	61,9	b

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Pada Tabel 4 dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik menggunakan lama kejutan 0,5 ms dan jumlah kejutan 4x dengan nilai 61,9%. Setelah itu dilakukan uji regresi untuk mengetahui hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* terhadap integrasi GFP pada inti sperma, didapatkan persamaan kuadratnya adalah $y = -84,06 + 81,45x - 11,24x^2$ (untuk interaksi *Pulse length* 0,5ms dan *Pulse number*) dengan $R^2 = 0,73$ yang mempunyai titik puncak 63,23% pada jumlah kejutan (*Pulse number*) 3,62 kali, sedangkan untuk interaksi *Pulse length* 1ms dan *Pulse number* didapatkan tidak ada hubungan. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 15.



Gambar 15. Grafik hubungan antara Interaksi *Pulse length* 0,5ms dan *Pulse number* terhadap integrasi GFP pada inti sperma

Pada Gambar 15, secara keseluruhan dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik pada lama kejutan 0,5ms dan jumlah kejutan 3,62 kali dengan nilai 63,23%. Adanya GFP yang terintegrasi sampai ke inti sel sperma menunjukkan bahwa kejutan listrik mempengaruhi daerah integrasi DNA yang diinsertkan melalui teknik elektroporasi. Menurut Miklavc dan Tadej (2009), Jika nilai dari dua parameter yaitu lama dan jumlah kejutan tidak terlalu besar, rata-rata dari jumlah molekul yang masuk ke dalam sel juga meningkat dengan peningkatan dari jumlah kejutan. 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.

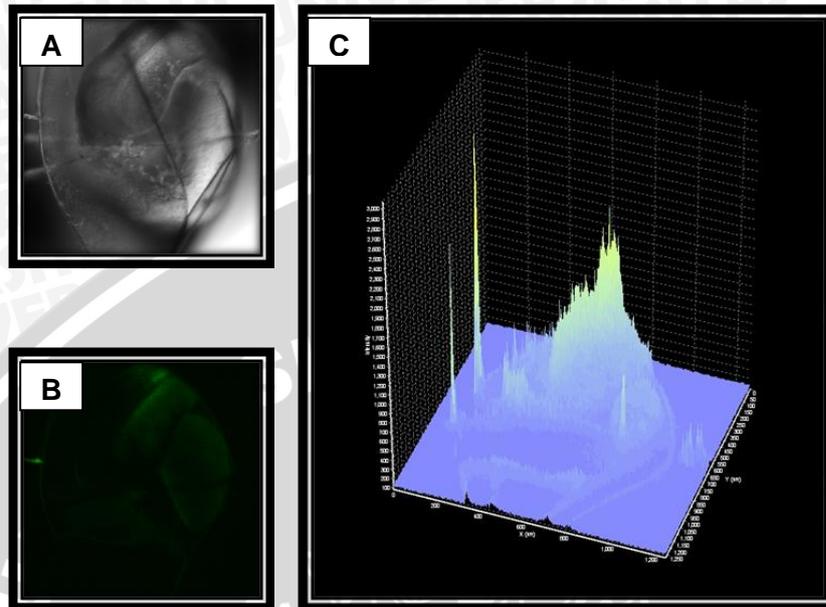
b. Ekspresi gen GFP pada embrio

Setelah sperma diberi perlakuan (diberi tegangan 40 volt dan pemberian lama kejutan dan jumlah kejutan yang berbeda), selanjutnya sperma tersebut difertilisasikan ke telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) guna mengetahui apakah sperma hasil elektroporasi tersebut mampu untuk membuahi telur. Apabila telur yang diamati di mikroskop konvokal berpendar hijau maka yang membuahi telur tersebut adalah sperma yang membawa GFP.

Seperti yang terlihat pada Gambar 16 yaitu embrio kontrol terdapat sedikit pendaran warna hijau, pendaran tersebut merupakan *autoflorescent* yang dimiliki oleh embrio. Pendaran tersebut terlihat merata pada hampir semua bagian telur. Pada analisa intensitasnya didapatkan nilai pendarannya 1500 *arbitrary*, nilai intensitas tersebut relatif rendah.

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

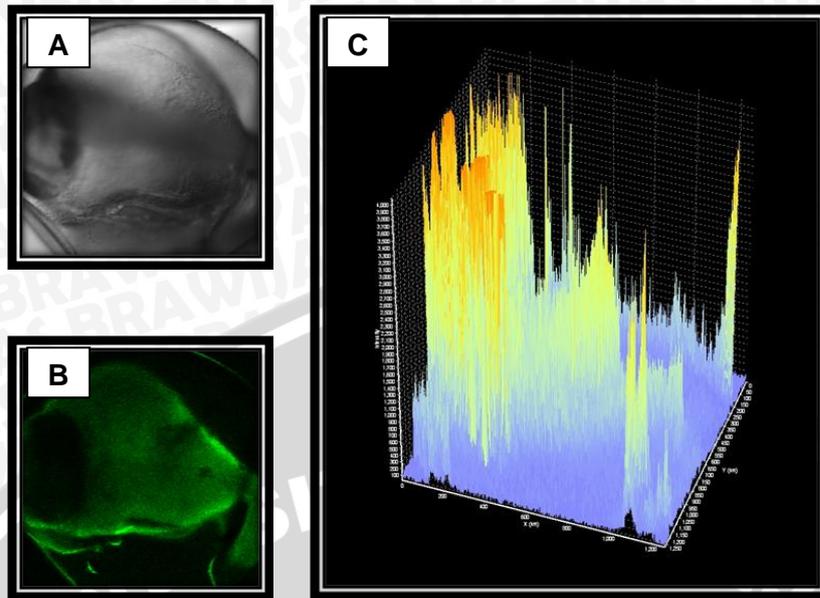
disebabkan oleh kombinasi *autofluorescent*, latar belakang dari ikatan permukaan *fluorescence*.



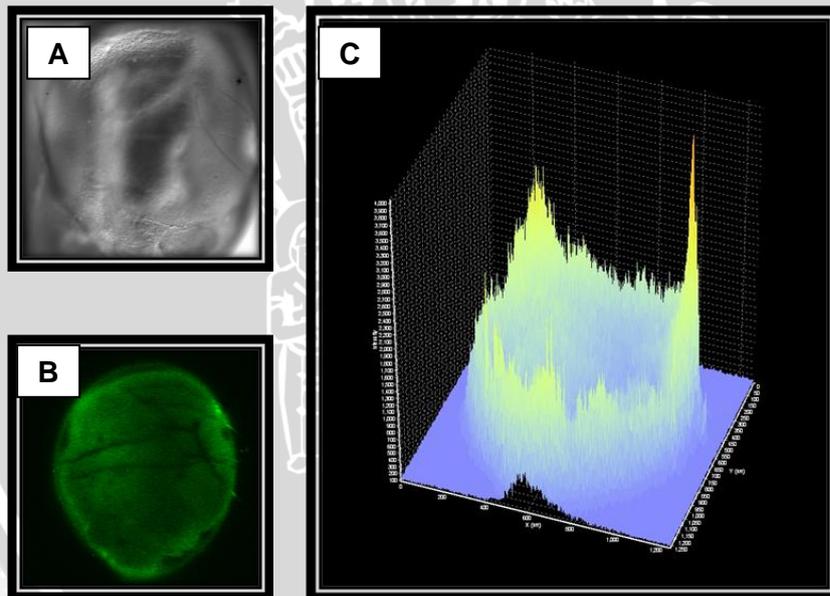
Gambar 16. Ekspresi embrio kontrol dengan perbesaran 50x
A. tampilan pada layar DIC
B. tampilan pada layar fluorescent
C. intensitas pendaran GFP embrio kontrol

Pendaran GFP tertinggi terdapat pada perlakuan 0,5 ms 4x dengan nilai intensitanya 4000 *arbitrary*, seperti yang disajikan pada Gambar 17. Sedangkan pendaran GFP terendah pada perlakuan 1 ms 4x dengan nilai intensitasnya 2500 *arbitrary*, seperti yang disajikan pada Gambar 18. Untuk mengetahui keseluruhan nilai pendaran intensitas GFP pada embrio dapat dilihat pada Lampiran 11.

Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa pada semua embrio hasil fertilisasi sperma perlakuan menunjukkan pendaran GFP. Dengan demikian GFP mampu terekspresi pada sel telur sehingga memunculkan warna hijau akibat protein gugus *chromophore*. Untuk mengetahui keseluruhan hasil pengamatan fluorensi GFP pada embrio dapat dilihat pada Lampiran 10.



Gambar 17. Ekspresi embrio perlakuan 0,5 ms 4x dengan perbesaran 50x
 A. tampilan pada layar DIC
 B. tampilan pada layar fluorescent
 C. intensitas pendaran GFP embrio



Gambar 18. Ekspresi embrio perlakuan 1 ms 4x dengan perbesaran 50x
 A. tampilan pada layar DIC
 B. tampilan pada layar fluorescent
 C. intensitas pendaran GFP embrio

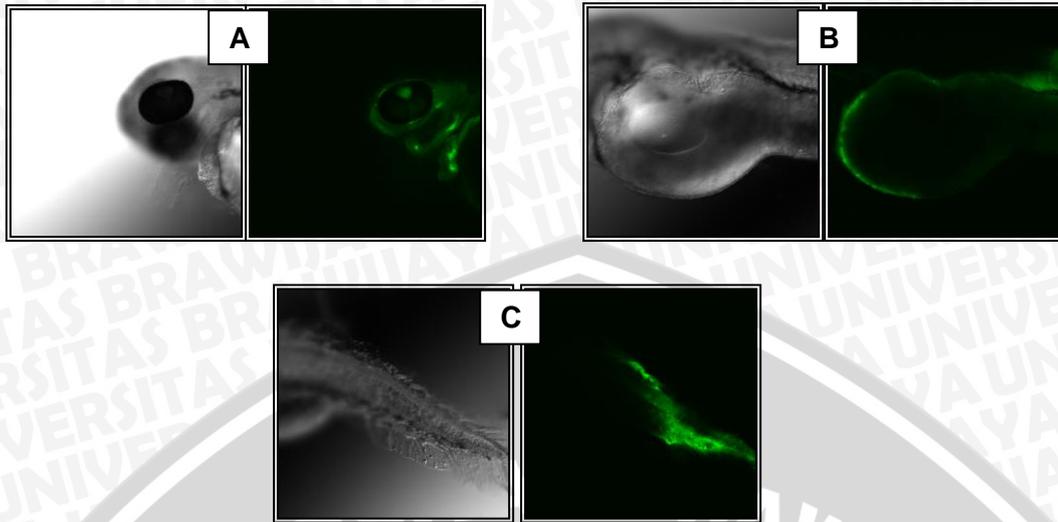
GFP adalah protein yang mengandung asam amino 238 (26,9 KDa) dari spesies ubur-ubur *Aequorea Victoria* yang bisa berflouresensi warna hijau dengan adanya penyinaran warna biru (sinar ultraviolet). Dengan menggunakan

GFP ini maka peneliti bisa mengembangkan cara untuk melacak sintesis protein, menentukan lokasi protein tertentu, atau mengetahui pergerakan protein di dalam sel makhluk hidup (Anonymous, 2009f).

Menurut Anonymous (2007), di dalam protein GFP ada gugus yang disebut chromophore yang berperan sangat penting dalam proses berpendaran hijau. Ketika dikenai energi cahaya biru atau UV maka pada gugus ini akan terjadi reaksi oksidasi. Energi yang diserap membuat elektron-elektron di dalam gugus ini tereksitasi dan menghasilkan energi yang lebih rendah yaitu energi cahaya hijau. Chromophore ini adalah kelompok tiga residu asam amino di posisi 65 (Serin), 66 (Tirosin), dan 67 (Glisin) (Anonymous, 2007). Protein gugus chromophore ini dihasilkan sebagai bentuk ekspresi gen melalui proses transkripsi dan translasi.

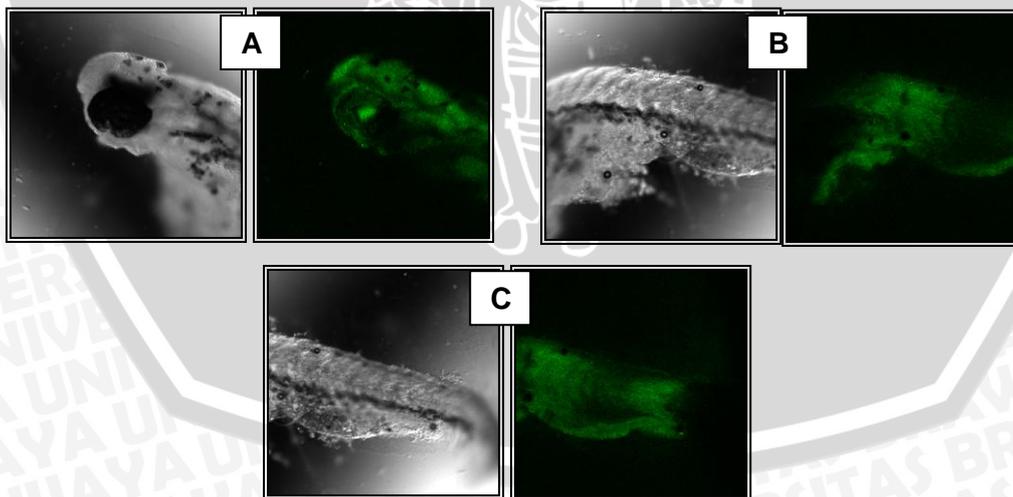
c. Ekspresi gen GFP pada larva

Pengamatan ekspresi gen GFP pada larva perlu dilakukan karena untuk mengetahui efektifitas sperma yang telah dielektroporasi dan diberi gen GFP, apakah gen GFP yang diinsertkan pada sperma mampu terekspresi pada larva atau tidak. Pada larva kontrol terlihat samar-samar berwarna hijau, tetapi warna tersebut bukan pendaran GFP melainkan *autofluorescent* yang dimiliki larva tersebut karena sperma kontrol tidak diberi perlakuan kejutan listrik dan tambahan gen GFP. Pada hasil analisa intensitas larva kontrol terlihat adanya pendaran GFP yang rendah, yaitu pada bagian kepala 2900 *arbitrary*, bagian perut 1800 *arbitrary* dan bagian ekor 2100 *arbitrary* seperti yang disajikan pada gambar 19. Untuk mengetahui keseluruhan hasil pengamatan fluorensi GFP pada larva dapat dilihat pada Lampiran 12.

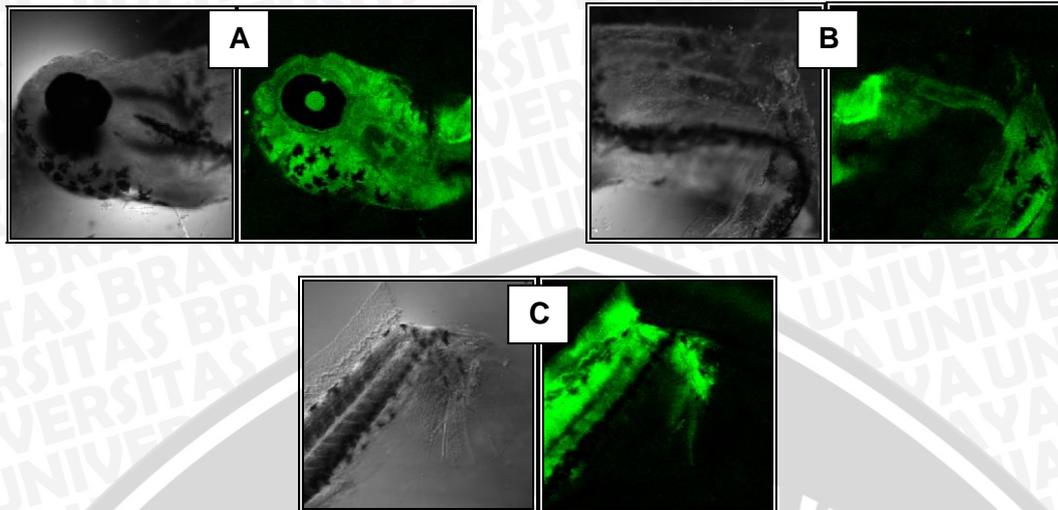


Gambar 19. Ekspresi GFP pada larva kontrol perbesaran 40x
 A. bagian kepala
 B. bagian perut
 C. bagian ekor

Ekspresi GFP pada larva perlakuan yang paling rendah terdapat pada perlakuan 0,5 ms 2x dengan nilai intensitas pada bagian kepala 2800 *arbitrary*, bagian perut 2000 *arbitrary* dan bagian ekor 2200 *arbitrary* seperti yang disajikan pada Gambar 20. Untuk mengetahui keseluruhan nilai pendaran intensitas GFP pada larva dapat dilihat pada Lampiran 13.



Gambar 20. Ekspresi GFP pada larva perlakuan 0,5ms 2x kejutan perbesaran 40x
 A. bagian kepala
 B. bagian perut
 C. bagian ekor



Gambar 21. Ekspresi GFP pada larva perlakuan 1ms 4x kejutan perbesaran 40x
A. bagian kepala
B. bagian perut
C. bagian ekor

Sedangkan ekspresi GFP paling tinggi terdapat pada perlakuan 1 ms 4x dengan nilai intensitas bagian kepala 4000 *arbitrary*, bagian perut 3400 *arbitrary* dan bagian ekor 4000 *arbitrary* seperti yang disajikan pada Gambar 21.

Hasil pengamatan diatas menunjukkan bahwa pada larva ikan mas umur 20 jam masih memendarkan gen GFP, dan pendaran GFP tersebut terlihat hampir merata pada semua bagian tubuh (kepala, perut dan ekor). Kestabilan ekspresi gen ditentukan pula oleh konstruksi gen, pada penelitian ini berupa konstruksi plasmid sirkuler dengan β -actin medaka sebagai promoter dan hrGFP sebagai gen target. Menurut Hacket (1993), salah satu hal yang penting dalam kegiatan transgenesis 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. 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.

Selain itu menurut Purwanti (2007), promotor β -actin memiliki beberapa sifat yang terkait dengan aktifitas elemen-elemennya yaitu *constitutive*, *ubiquitous* dan *house keeping* (Volckaert, 1994). *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.

4.2 Motilitas Sperma Kontrol

Motilitas adalah kemampuan sperma untuk bergerak maju (progresif). Daya gerak progresif sangat menentukan kualitas spermatozoa dalam hubungannya dengan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Saili, 1999). Dari hasil pengamatan, nilai motilitas sperma kontrol I (sebelum) 80% dan kontrol II (sesudah) 65% dengan selang waktu $\pm 1,5$ jam (lihat Tabel 5). Nilai persentase sperma kontrol tersebut dalam keadaan bagus dan normal karena menurut Paisal (2008), motilitas sperma kurang dari 40% kurang baik dalam proses pembuahan telur yang menyebabkan pembuahan tidak berhasil.

Effendy (1997) menyatakan bahwa kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis hanya berkisar antara 1-2 menit. Menurut Suquest (1994) bahwa di alam, durasi motilitas terjadi dalam periode yang sangat pendek pada ikan air tawar. Selanjutnya dikatakan oleh Ginzburg (1972), bahwa sperma ikan mas hanya hidup selama 30 – 60 detik dalam air. Untuk menjaga daya tahan hidup sperma agar tetap optimal, maka dalam penelitian ini sperma diencerkan dengan menggunakan NaCl fisiologis dengan perbandingan 1:1. Karena 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).

Untuk menjaga agar kondisi sperma tidak berubah, *appendorf* yang berisi sperma diletakkan pada wadah yang berisi es karena menurut Stoss (1983), suhu yang rendah dapat menstabilkan kondisi fisika-kimia sperma selama perlakuan. Selain itu Anonymous (2007b) menyatakan bahwa 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. Pembekuan yang lambat akan mencegah munculnya kristal es tetapi akan menyebabkan naiknya konsentrasi garam dan tekanan osmotik yang akan merusak protein yang dikandung oleh sel.

4.3 Motilitas Sperma Perlakuan

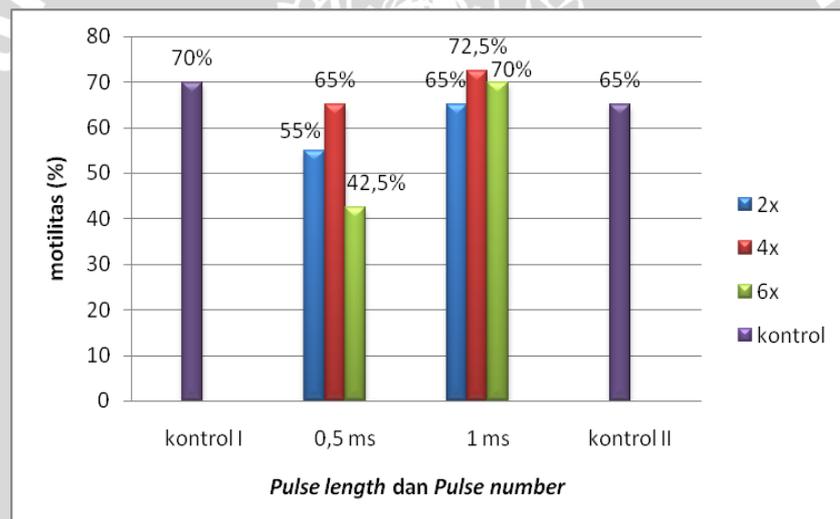
Menurut Handarini (2004), spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit. Pengikatan gen oleh sperma optimal bila sperma dalam keadaan motil dan konsentrasi DNA cukup tinggi. Pengamatan motilitas sperma pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung persentase motilitas sperma dalam satu bidang pandang lensa mikroskop.

Dari hasil penelitian diketahui pengaruh perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda terhadap motilitas sperma. Persentase motilitas sperma setelah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5 berikut ini.

Tabel 5. Pengaruh pemberian *Pulse length* dan *Pulse number* yang berbeda terhadap motilitas sperma ikan mas (%)

Perlakuan	Ulangan		Jumlah	Rerata (%)
	1	2		
Kontrol I	80	80	160	80
0,5 ms 2x	60	50	110	55
0,5 ms 4x	60	70	130	65
0,5 ms 6x	40	45	85	42,5
1 ms 2x	65	65	130	65
1 ms 4x	75	70	145	72,5
1 ms 6x	70	70	140	70
Kontrol II	70	60	130	65

Dari data pada Tabel 5 menunjukkan bahwa rerata persentase perlakuan elektroporasi lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol. Nilai persentase motilitas sperma dapat dilihat pada Gambar 22 berikut ini.



Gambar 22. Histogram persentase motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Pada gambar 22 menunjukkan bahwa nilai rata-rata motilitas tertinggi terdapat pada lama kejutan 1 ms dengan 4x kejutan (72,5%), sedangkan nilai terendah ada pada lama kejutan 0,5 ms dengan 6x kejutan (42,5%). *Sin et al.*, (1993) menyatakan bahwa kekuatan ion pada buffer elektroporasi mempengaruhi kelangsungan hidup sperma. Pada kekuatan ion yang rendah persentase motilitas sperma lebih dari 60% ketika sperma diberi perlakuan dengan medan listrik tinggi dan lama kejutan (*Pulse length*) yang lama.

Sedangkan menurut Takahashi *et al.*, (1991) dan Tekle *et al.*, (1991), kenaikan nilai motilitas dapat diimbangi dengan pengurangan lama kejutan (*Pulse length*). Cheng (2003) menyatakan bahwa dengan metode elektroporasi, motilitas sperma telah diamati setelah perlakuan elektroporasi dengan variasi kekuatan kejutan dan lama kejutan, bahwa motilitas sperma menurun dengan kenaikan voltase kejutan.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian lama kejutan dan jumlah kejutan yang berbeda terhadap daya motilitas sperma, maka dilakukan analisa sidik ragam (Lampiran 3) yang disajikan pada Tabel 6 berikut ini.

Tabel 6. Hasil sidik ragam motilitas sperma ikan mas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan Kombinasi	5	1.241,67	248,334	-	-	-
a. <i>Pulse Length</i> (PL)	1	675	675	32,40**	5,99	13,75
b. <i>Pulse Number</i> (PN)	2	329,17	164,585	7,90*	5,14	10,92
c. Interaksi PL dan PN	2	237,5	118,75	5,7*	5,14	10,92
2. Acak	6	125	20,83	-	-	-
3. TOTAL	11	1.366,67	-	-	-	-

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

* = berbeda nyata

Hasil perhitungan sidik ragam motilitas sperma, menunjukkan bahwa perlakuan dengan lama kejutan (*Pulse length*) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap daya motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan nilai F hitung (32,40) > F Tabel 1% yang berarti berbeda sangat nyata atau menerima H_1 dan menolak H_0 . Demikian pula pemberian jumlah kejutan (*Pulse number*) dan interaksi antara lama kejutan dan jumlah kejutan juga memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 .

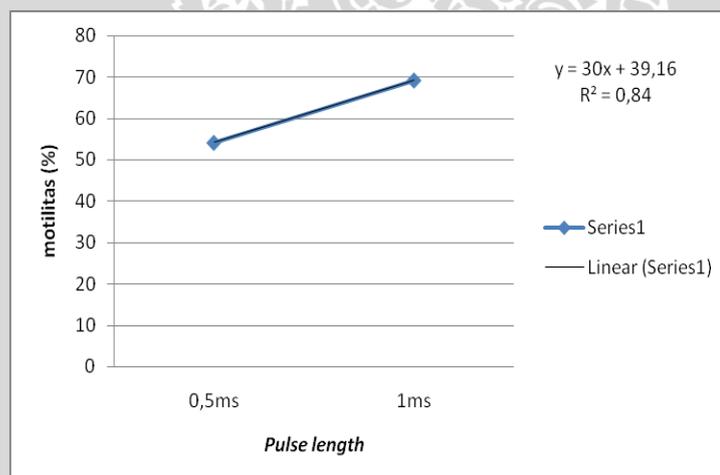
Selanjutnya dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui pengaruh pemberian lama kejutan (*Pulse length*) (Lampiran 3) seperti yang tersaji pada Tabel 7.

Tabel 7. BNT (Beda Nyata Terkecil) *Pulse Length* terhadap Motilitas Sperma

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
0,5 ms	54,16	a
1 ms	69,16	b

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Berdasarkan Tabel BNT maka urutan perlakuan *pulse length* terbaik adalah 1 ms diikuti oleh *pulse length* 0,5 ms. Dari perhitungan regresi (Lampiran 3) didapatkan persamaan regresi linier, yaitu $y = 39,16 + 30x$ yang merupakan bentuk hubungan antara lama kejutan (*Pulse length*) dan motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*), seperti yang ditampilkan Gambar 23 berikut ini.



Gambar 23. Grafik hubungan antara *Pulse length* dan motilitas sperma

Dari Gambar 23 diketahui bahwa nilai motilitas semakin meningkat dengan penambahan lama kejutan. Dapat disimpulkan perlakuan lama kejutan (*Pulse length*) 1ms memberikan nilai motilitas lebih tinggi daripada pemberian lama kejutan 0,5 ms. Menurut Rols dan Justin (1998) bahwa durasi kejutan listrik yang lebih panjang memiliki efisiensi permeabilisasi yang lebih tinggi serta banyaknya

jumlah kejutan dapat mengontrol penyerapan makromolekul ke dalam sel sehat, meski dalam durasi (lama) kejutan yang singkat.

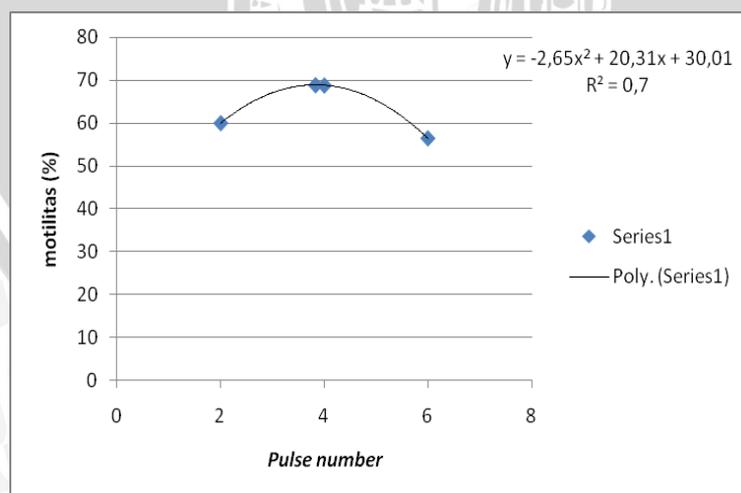
Kemudian dilakukan uji BNT jumlah kejutan (*Pulse number*) (Lampiran 3) untuk mengetahui pengaruhnya terhadap motilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) pada Tabel 8 berikut ini.

Tabel 8. BNT *Pulse Number* terhadap Daya Motilitas

Jumlah kejutan	Rata-rata	Notasi
B3 = 6x	56,25	a
B1 = 2x	60	a
B2 = 4x	68,75	b

Keterangan = notasi sama berarti tidak berbeda

Pada Tabel 8 dapat diketahui bahwa perlakuan *pulse number* terbaik menggunakan jumlah kejutan (*Pulse number*) 4x dengan nilai 68,75% kemudian 2x dan 6x yaitu 60% dan 56,25%. Setelah itu dilakukan uji regresi untuk mengetahui hubungan antara jumlah kejutan (*Pulse number*) dengan persentase motilitas, didapatkan persamaan kuadratnya $y = 30,01 + 20,31x - 2,65x^2$ dengan $R^2 = 0,7$ yang mempunyai motilitas terbesar 68,92% pada jumlah kejutan (*Pulse number*) 3,83. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 24.



Gambar 24. Grafik hubungan antara *Pulse number* dan motilitas sperma

Dari Gambar 24 dapat dilihat bahwa pemberian jumlah kejutan (*Pulse number*) 3,83 kali memberikan nilai motilitas tertinggi yaitu sebesar 68,92%. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Rambabu *et al.*, (2005), yang mentransfer luciferase pada ikan zebra, diperoleh aktifitas maksimum dari luciferase terjadi pada 6 kali kejutan dan menurun pada jumlah kejutan yang lebih tinggi atau lebih rendah. Hal ini menunjukkan ketergantungan ekspresi gen reporter pada jumlah kejutan dan tegangan yang digunakan memperlihatkan adanya pengaruh signifikan dalam memasukkan DNA pada sel.

Kemudian dilakukan uji BNT interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* (Lampiran 2) seperti yang terlihat pada Tabel 6 berikut ini.

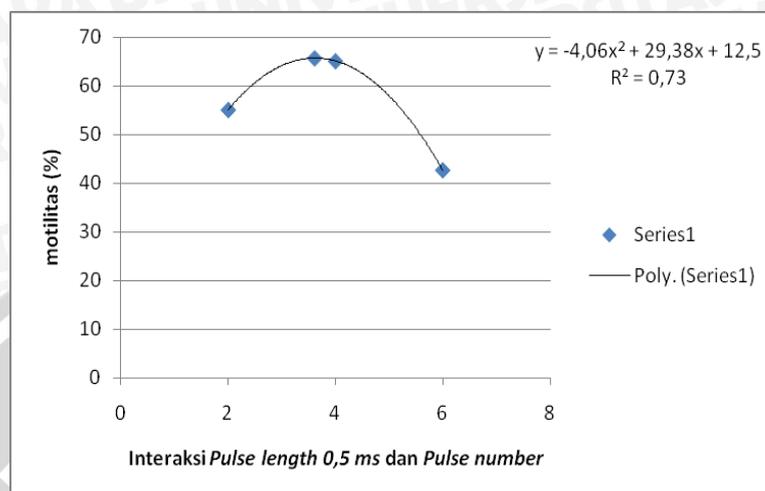
Tabel 9. Uji BNT Interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* terhadap motilitas sperma

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
0,5 ms 6x	42,5	a
0,5 ms 2x	55	b
0,5 ms 4x dan 1 ms 2x	65	bc
1 ms 6x	70	c
1 ms 4x	72,5	c

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Pada Tabel 9 dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik menggunakan lama kejutan 1 ms dan jumlah kejutan 4x dengan nilai 72,5%. Setelah itu dilakukan uji regresi untuk mengetahui hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan persentase motilitas sperma, didapatkan persamaan kuadratnya adalah $y = 12,5 + 29,38x - 4,06x^2$ (untuk interaksi *Pulse length* 0,5ms dan *Pulse number*) dengan $R^2 = 0,73$ yang mempunyai titik puncak 65,65% pada jumlah kejutan (*Pulse number*) 3,61 kali, sedangkan untuk interaksi

Pulse length 1ms dan *Pulse number* didapatkan tidak ada hubungan. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 25.



Gambar 25. Grafik hubungan antara Interaksi *Pulse length* 0,5ms dan *Pulse number* terhadap motilitas sperma

Dari Gambar 25, secara keseluruhan dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik pada lama kejutan 0,5ms dan jumlah kejutan 3,61 kali dengan nilai motilitas terbesar 65,65%. Mersereau *et al.*, (1990) melaporkan pengaruh tegangan dan Shen dan Forde (1989) menyelidiki hubungan antara voltase dan lama kejutan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan jumlah kejutan listrik dapat meningkatkan efisiensi elektroporasi dalam *A. tumefaciens*. Sedangkan menurut Sin *et al.*, (1993) yang melakukan penelitian tentang motilitas sperma ikan *Chinhook salmon* setelah dielektroporasi, motilitas sperma berkurang dengan bertambahnya medan listrik dan lama kejutan. Bila diberi dua kejutan, masing – masing 27,4 ms pada 1000V/cm, motilitas sperma mendekati 5%. Kajian efek elektroporasi pada viabilitas sel cenderung berkurang kelangsungan hidupnya seiring dengan bertambahnya kekuatan medan listrik dan lama kejutan.

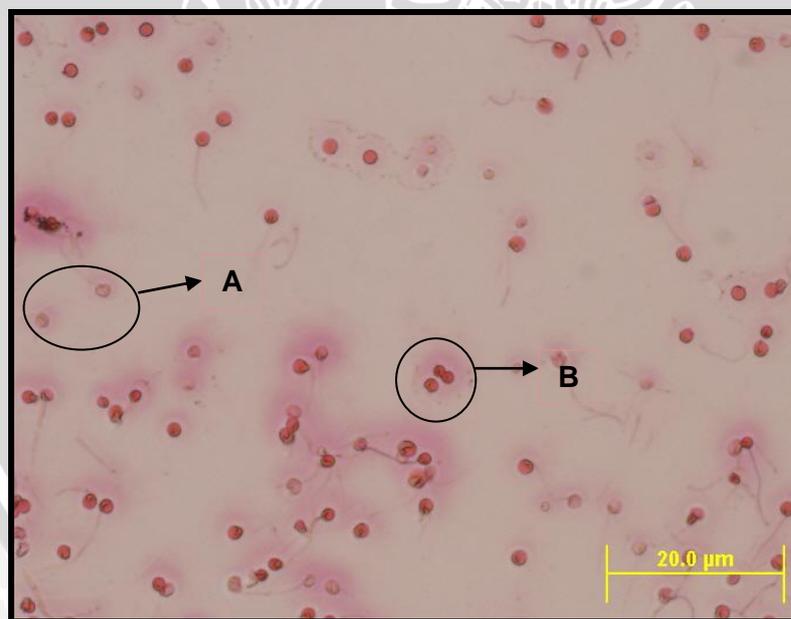
Selama elektroporasi, membran sel dengan cepat dipolarisasikan pada voltase yang tinggi untuk waktu yang singkat sehingga mengakibatkan

kerusakan secara fisik dan kerusakan pada pori-pori. Hal ini mengakibatkan peningkatan daya konduksi dan permeabilitas DNA dan molekul lainnya (Zimmermann, 1982).

4.4 Mortalitas dan Viabilitas Sperma Kontrol

Dalam penelitian ini pengamatan sperma kontrol dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu sebelum dan sesudah perlakuan. Sperma kontrol yang dimaksud adalah sperma murni yang tidak diberi kejutan listrik maupun gen GFP.

Mortalitas sperma diamati dengan menghitung persentase sperma yang mati dan total sperma, setelah diberi pewarna *eosin negrosin*. Menurut BjoÈrndahl *et al.*, (2003) teknik pewarna *eosin negrosin* sangat mudah dan dapat dipercaya untuk menandai sperma hidup dan mati. Eosin berfungsi sebagai penanda sel-sel mati, sedangkan negrosin memberikan warna pada latar belakang.



Gambar 26. Mortalitas sperma kontrol perbesaran 40x
A. sperma hidup
B. sperma mati

Seperti yang ditunjukkan Gambar 26, sperma hidup berwarna transparan (sedikit menyerap warna), sedangkan sperma mati berwarna lebih merah.

Penilaian persentase sperma hidup dan mati bertujuan untuk mengetahui viabilitas membran sperma. Seperti yang dijelaskan oleh Revay *et al.*, (2004) teknik pewarnaan sel dapat menentukan morfologi dan integritas membran meliputi morfologi, sperma normal, daya tahan hidup dan keutuhan akrosom.

Hasil pengamatan mortalitas sperma kontrol menunjukkan bahwa sperma kontrol I (sebelum) memiliki persentase mortalitas yang rendah (39,17%) bila dibandingkan dengan kontrol II (sesudah) (48,97%) (lihat Tabel 10). Hal ini menunjukkan adanya penurunan kualitas sperma setelah dilakukannya striping dan selama perlakuan elektroporasi dilakukan. Untuk mengatasi lonjakan mortalitas sperma, sperma disimpan dalam wadah yang berisi es agar dapat bertahan lebih lama. Karena menurut Toelihere (1981), kemampuan hidup spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan bertahan lebih lama dalam suhu yang rendah.

Pengamatan viabilitas (daya tahan hidup) sperma dilakukan dengan mencatat waktu viabilitas (menit) yaitu mulai bergerak lamban, bergerak berputar ditempat (*reservoir*), berdenyut lemah sampai tidak berdenyut lagi atau mati. Dari pengamatan, didapatkan waktu viabilitas sperma ikan mas kontrol (tanpa perlakuan hanya pengenceran dengan Na-fis) selama ± 1 jam (Lampiran 17). Sedangkan menurut Hidayaturrahmah (2007), viabilitas sperma ikan mas kontrol (tidak diberi perlakuan dan tanpa pengenceran) adalah selama 6 menit.

Pengamatan terhadap viabilitas sperma dilakukan dengan selang waktu 30 menit. Viabilitas sperma ditentukan dengan cara menghitung jumlah sperma yang hidup dari 100 sperma yang dihitung dan hasilnya dinyatakan dalam persen (Suarni, 2009).

Hasil perhitungan konsentrasi sperma (Lampiran14) yaitu $7,648 \times 10^8$ sel/ml, spema diencerkan 100x dengan volume sperma 10 μ l yang diencerkan

dengan Na-fis sebanyak 990 μ l. Menurut Ginzburg (1972), volume sperma ikan mas yang dapat dikeluarkan per-ejakulasi adalah sebanyak 2.36 – 3.44 cc dengan rata-rata 2.90 cc. Jumlah spermatozoa per cc minimum 23.8×10^9 , maksimum 25.6×10^9 dengan rata-rata 24.7×10^9 . Adanya perbedaan jumlah konsentrasi sperma, erat kaitannya dengan volume semen ikan bersangkutan. Makin besar volume maninya, maka semakin rendah konsentrasinya dan demikian sebaliknya. Seperti yang dilaporkan oleh Saad dan Billard (1987) bahwa ikan mas yang disuntik dengan ekstrak hipofisa ikan mas terbukti mempengaruhi volume dan konsentrasi spermatozoa : semakin tinggi volume sperma, semakin rendah konsentrasi spermatozoanya.

Induk jantan ikan mas yang digunakan dalam penelitian memiliki berat 907,2 gram (0,9 kg) dan panjang tubuh 32 cm, berdasarkan ukuran tersebut induk jantan yang digunakan memiliki kualitas yang cukup baik. Karena menurut Rustidja (2005), ciri induk ikan mas yang telah matang gonad yaitu sudah mencapai TKG I pada umur 10-12 bulan dengan berat badan minimal 0,5 kg.

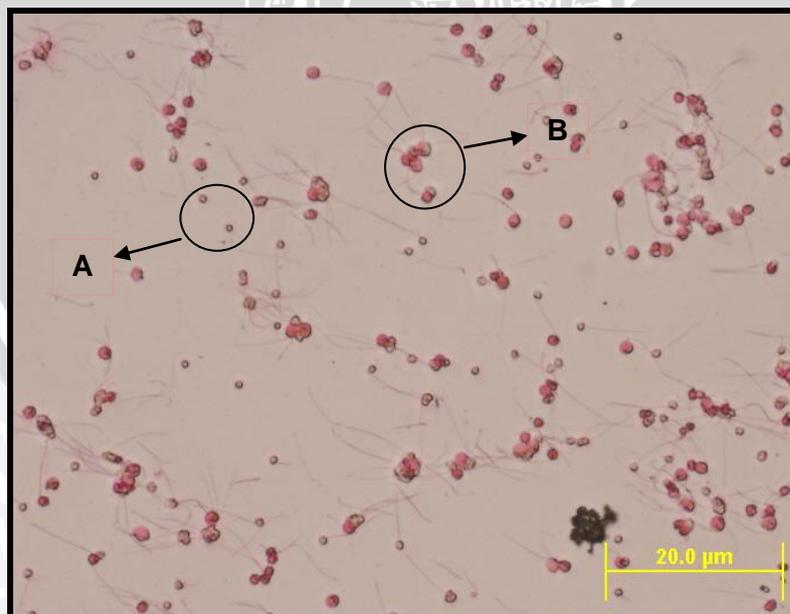
Dari Gambar sperma, diketahui bahwa panjang total sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) $\pm 11,5 \mu$ m dengan lebar kepala $\pm 2,7 \mu$ m (Lampiran 15). Sedangkan menurut Anonymous (2009b), sel sperma mempunyai ukuran panjang keseluruhan 50 – 60 μ m, dimana terdiri dari dua bagian yaitu bagian kepala dan ekor. Dimensi kepala dengan panjang 4 - 5 μ m, lebar 2,5 - 3,5 μ m, dengan rasio antara panjang dan lebar yaitu 1,50 – 1,75 μ m.

4.5 Mortalitas dan Viabilitas Sperma Perlakuan

Mortalitas adalah ukuran jumlah kematian pada suatu populasi (Anonymous, 2010f). Mortalitas sperma perlakuan perlu diamati karena hasilnya akan digunakan untuk menentukan tingkat viabilitas dan selanjutnya untuk keberhasilan teknik transfer gen GFP. Alasannya, setelah sperma

dielektroporasi kemudian difertilisasikan ke telur ikan mas (*Cyprinus carpio*), maka akan diketahui apakah embrio hasil fertilisasi tersebut mengekspresikan gen GFP atau tidak. Sebagaimana yang dikatakan oleh Gandolfi *et.al.*, (1989) spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit.

Pada sperma perlakuan, setelah sperma diberi perlakuan dan selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan eosin negrosin, tampak lebih banyak sperma yang mati (seperti yang disajikan pada Gambar 27). Hal ini terjadi karena adanya kerusakan permeabilitas membran sperma akibat kejutan listrik sehingga menjadi penyebab utama banyaknya jumlah sperma yang mati. Sesuai dengan pernyataan Anonymous (2009e), pada saat elektroporasi, terjadi kejutan listrik selama beberapa milidetik sehingga untuk sementara membuat peningkatan permeabilitas pori-pori di membran sel. Rusaknya permeabilitas membran dan kematian sperma inilah yang menyebabkan sperma banyak yang terwarnai oleh eosin negrosin.



Gambar 27. Mortalitas sperma perlakuan
A. sperma hidup
B. sperma mati

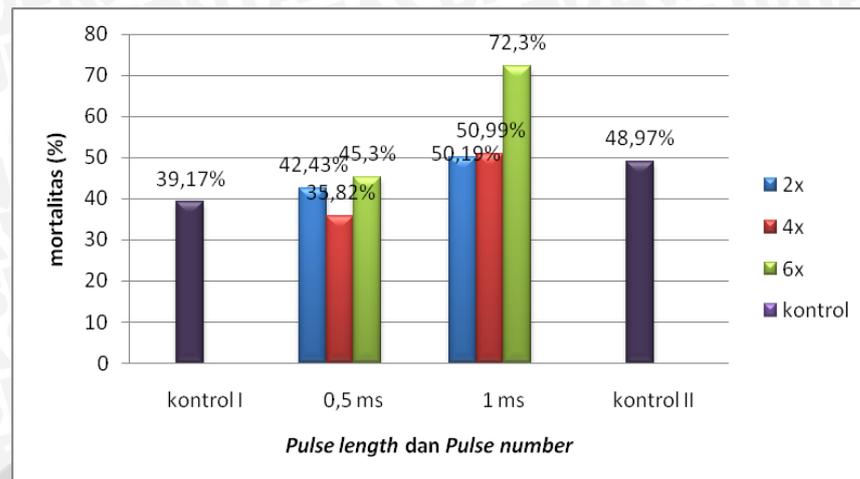
Dari Gambar 27 terlihat perbedaan sperma hidup dan mati yaitu sperma hidup menyerap warna sedikit sehingga berwarna transparan dan sperma mati menyerap warna banyak sehingga berwarna merah. Menurut Afriantini *et al.*, (2005), sperma yang telah mati permeabilitas membran menjadi tinggi akibatnya akan mudah terjadi penyerapan warna karena membran plasma yang sudah kehilangan fungsinya. Sedangkan menurut Toelihere (1985) penghitungan mortalitas sperma dilakukan di bawah mikroskop dengan cara menggunakan “hand tally counter” sedemikian rupa sehingga dapat ditemukan sperma yang mati.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa pemberian *Pulse length* dan *Pulse number* memberikan hasil yang berbeda terhadap mortalitas sperma. Persentase mortalitas sperma dapat dilihat pada Tabel 10 berikut ini :

Tabel 10. Pengaruh pemberian *Pulse length* dan *Pulse number* yang berbeda terhadap mortalitas sperma ikan mas (%)

Perlakuan	Ulangan		Rerata (%)
	1	2	
Kontrol I	39,17	-	39,17
0,5 ms 2x	35,25	49,16	42,43
0,5 ms 4x	30,69	40,96	35,82
0,5 ms 6x	48,30	42,30	45,3
1 ms 2x	54,50	45,89	50,19
1 ms 4x	54,94	47,05	50,99
1 ms 6x	76,81	67,82	72,31
Kontrol II	48,97	-	48,97

Dari data pada Tabel 10 menunjukkan bahwa rerata persentase mortalitas perlakuan elektroporasi lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Nilai persentase mortalitas sperma dapat dilihat pada Gambar 28 di bawah ini.



Gambar 28. Histogram persentase mortalitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Dari Gambar 28 diketahui bahwa nilai mortalitas tertinggi terdapat pada lama kejutan 1 ms dengan 6x kejutan (72,3%) dan nilai mortalitas terendah terdapat pada lama kejutan 0,5 ms dengan 4x kejutan (35,82%). Dapat dilihat bahwa terjadi penurunan mortalitas (tingkat kematian) sperma sementara, kemudian terjadi peningkatan jumlah kematiannya dengan semakin bertambahnya pemberian lama kejutan dan jumlah kejutan. Sesuai dengan pernyataan Pavlin *et al.*, (2005) bahwa ketika medan listrik terlalu tinggi, untuk pemberian jumlah dan lama kejutan perubahan fisiologi sel menjadi terlalu besar untuk diperbaiki sehingga sel dapat kehilangan banyak isinya atau membengkak yang akhirnya mengarah pada kematian sel.

Nilai mortalitas berbanding terbalik dengan nilai viabilitas, jika nilai mortalitas rendah maka nilai viabilitasnya tinggi begitu juga sebaliknya. Dari pengamatan viabilitas pada sperma perlakuan (Lampiran 16) didapatkan waktu viabilitas terlama (tertinggi) pada lama kejutan 0,5 ms dengan 4x kejutan yaitu selama 1 jam 45 menit dan waktu viabilitas tersingkat (terendah) pada lama kejutan 1 ms dengan 6x kejutan yaitu selama 40 menit. Sedangkan Hidayaturrehman (2007)

menyatakan bahwa viabilitas sperma ikan mas yang menggunakan fruktosa sebagai bahan pengencer adalah selama 267, 67 menit (4 jam 46 menit).

Untuk mengetahui pengaruh pemberian lama kejutan dan jumlah kejutan yang berbeda terhadap daya mortalitas sperma, maka dilakukan analisa sidik ragam (Lampiran 4) yang telah disajikan pada Tabel 11 di bawah ini.

Tabel 11. Hasil sidik ragam mortalitas sperma

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan Kombinasi	5	1.555,73	311,46	-	-	-
a. Pulse Length	1	831,66	831,66	17,66**	5,99	13,75
b. Pulse Number	2	535,50	267,75	5,68*	5,14	10,92
c. Interaksi PL dan PN	2	188,57	94,28	2,00 ^{ns}	5,14	10,92
2. Acak	6	282,43	47,07	-	-	-
3. TOTAL	11	1.838,16	-	-	-	-

Hasil dari perhitungan sidik ragam mortalitas sperma, menunjukkan bahwa perlakuan dengan lama kejutan (*Pulse length*) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap daya mortalitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan nilai F hitung (25,574) > F Tabel 1% yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Demikian pula pemberian jumlah kejutan (*Pulse number*) juga memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap mortalitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan nilai F hitung (9,019) > F Tabel 5% (5,14) dan < dari F Tabel 1% (10,92) yang berarti juga menerima H_1 dan menolak H_0 . Sedangkan Interaksi antara lama kejutan dan jumlah kejutan yang hasilnya tidak berbeda nyata (F hitung < F 5%) yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1 .

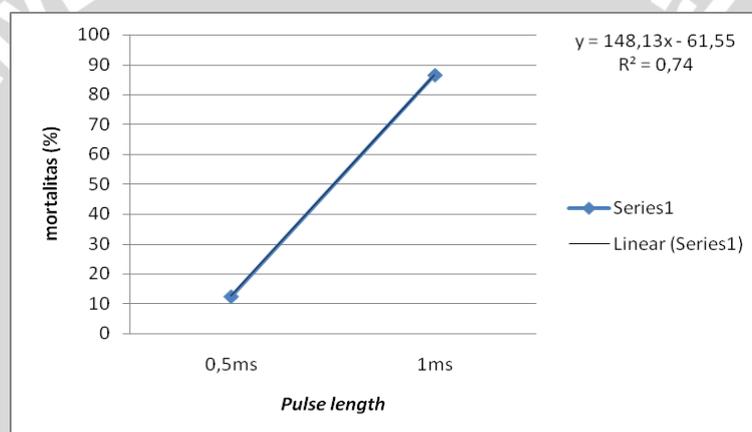
Selanjutnya dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui pengaruh pemberian lama kejutan (*Pulse length*) (Lampiran 4) seperti yang tersaji pada Tabel 12.

Tabel 12. BNT *Pulse Length* terhadap Mortalitas Sperma

Lama Kejutkan	Rata-rata	Notasi
0,5 ms	41,18	a
1 ms	57,83	b

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Dari Tabel 12 dapat diketahui bahwa perlakuan pemberian lama kejutan (*Pulse length*) 0,5 ms lebih baik bila dibandingkan dengan 1 ms. Kemudian didapatkan persamaan regresi linier, yaitu $y = -61,55 + 148,13x$ yang merupakan bentuk hubungan antara lama kejutan (*Pulse length*) dan mortalitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*), seperti yang ditampilkan Gambar 29 berikut ini.

Gambar 29. Grafik hubungan antara *Pulse length* dan mortalitas sperma

Dari Gambar 29 diketahui bahwa terjadi peningkatan nilai mortalitas (tingkat kematian) dengan adanya penambahan lama kejutan (*Pulse length*). Jadi dapat disimpulkan bahwa perlakuan terbaik dengan menggunakan lama kejutan (*Pulse length*) 0,5 ms karena nilai mortalitas (tingkat kematian) rendah sedangkan perlakuan 1 ms nilai mortalitasnya tinggi. 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.

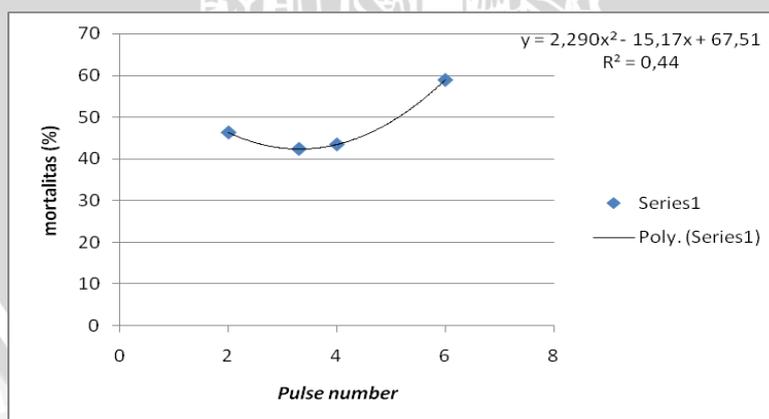
Kemudian dilakukan uji BNT jumlah kejutan (*Pulse number*) untuk mengetahui pengaruhnya masing-masing terhadap mortalitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) pada Tabel 13.

Tabel 13. BNT *Pulse Number* terhadap Mortalitas Sperma

Jumlah Kejutan	Rata-rata	Notasi
B2 = 4x	43,41	a
B1 = 2x	46,31	a
B3 = 6x	58,81	b

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Dari uji BNT pada Tabel 13 dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik adalah menggunakan jumlah kejutan (*Pulse number*) 4x (mortalitas 43,41%) dan yang terburuk pada jumlah kejutan 6x (mortalitas 58,81%). Setelah itu dilakukan uji regresi untuk mengetahui hubungan antara jumlah kejutan (*Pulse number*) dengan persentase mortalitas, didapatkan persamaan kuadratnya adalah $y = 67,51 - 15,175x + 2,29x^2$ dengan $R^2 = 0,44$ yang mempunyai titik puncak 42,37 pada jumlah kejutan 3,3.



Gambar 30. Grafik hubungan antara *Pulse number* dan mortalitas sperma

Dari Gambar 30 diketahui bahwa terjadi peningkatan nilai mortalitas (tingkat kematian) dari awal pemberian jumlah kejutan. Pemberian jumlah kejutan 6x memberikan nilai mortalitas tertinggi sedangkan jumlah kejutan 3,3x dan 4x

memberikan nilai mortalitas terendah. Jadi penggunaan jumlah kejutan 4x memberikan hasil yang baik karena nilai mortalitas (tingkat kematiannya rendah).

Menurut Canatella *et al.*, (2001), pengambilan gen dan kelulushidupan sel tergantung pada lama dan jumlah kejutan. Menurut Anonymous (2005), kejutan beberapa kali dapat digunakan untuk meningkatkan level dari pengikatan gen. Ditambahkan pula oleh Anonymous (2004), pada umumnya elektroporasi dilakukan dengan menggunakan 1 kali kejutan. Namun jika satu kejutan kurang efisien maka dua kejutan atau lebih untuk mencapai hasil yang diinginkan. Menurut Weaver (1993), penggunaan medan listrik yang tinggi prosentase pengambilan molekul oleh sel meningkat, tetapi prosentase kelulushidupan sel menurun secara serempak.

Penurunan nilai viabilitas sperma banyak dipengaruhi oleh suhu dan kandungan ion selama proses elektroporasi. Pada penelitian ini menggunakan larutan Na-fis (kandungan ion) sebanyak 275 μ l serta pendinginan kuvet kurang maksimal. Menurut Anonymous (2006), untuk meningkatkan resistensi sampel dapat dilakukan dengan cara : mengurangi temperatur sampel, mengurangi kadar ion pada bahan pengencer dan mengurangi volume cairan dalam cuvette.

Elektroporasi adalah penggunaan transmembran kejutan medan listrik untuk mendorong partikel mikroskopis pada pori-pori di bio-membran. Pori-pori tersebut biasa dinamakan 'elektropores'. Hal ini memungkinkan molekul, ion, dan air untuk masuk dari sisi membran yang lain. elektropore terletak di permukaan sel yang paling dekat dengan elektroda. Jika parameter medan kejutan listrik yang diberikan tepat, maka sel dapat pulih (elektropore kembali secara spontan) dan selanjutnya sel dapat tumbuh. Waktu yang diperlukan pori-pori untuk kembali ke bentuk semula yaitu sekitar 1 mikrodetik (Anonymous, 20010c). Parameter

penting untuk mendukung keberhasilan elektroporasi adalah tegangan, *pulse length* (waktu yang konstan) dan jumlah kejutan yang digunakan (Weiss, 2007).

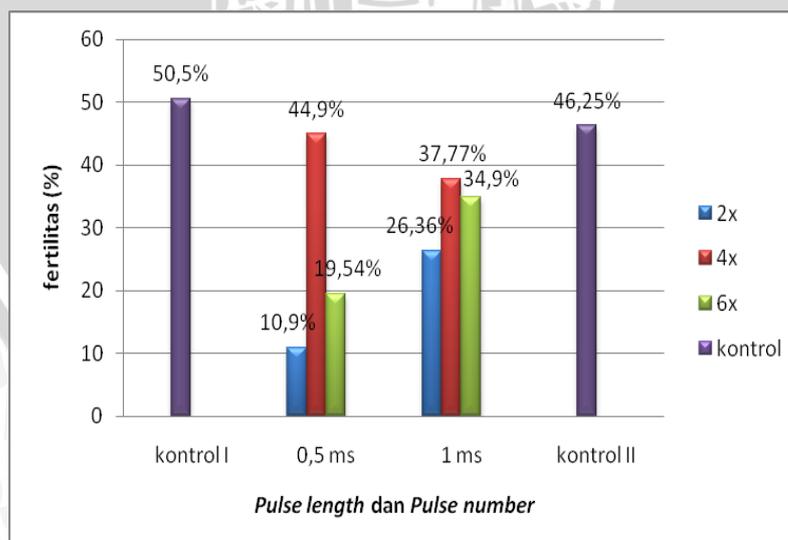
4.6 Fertilitas Sperma

Untuk mengetahui daya fertilitas sperma yang telah dielektroporasi, maka sperma difertilisasikan terhadap telur. Telur yang terfertilisasi terlihat adanya pembelahan dan kebanyakan berwarna kekuningan. Perhitungan data fertilitas yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 14 berikut ini.

Tabel 14. Data Fertilitas Sperma Ikan Mas

Perlakuan	Ulangan		Rerata (%)
	1	2	
Kontrol I	50,5	-	50,5
0,5 ms 2x	11,8	10	10,9
0,5 ms 4x	49,09	40,9	44,9
0,5 ms 6x	23,63	15,45	19,54
1 ms 2x	24,54	28,18	26,36
1 ms 4x	35,54	40	37,77
1 ms 6x	29,09	40,9	34,9
Kontrol II	46,25	-	46,25

Nilai persentase fertilitas sperma terhadap telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) dapat dilihat pada Gambar 31 di bawah ini.



Gambar 31. Histogram persentase fertilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Dari Gambar 31 diketahui terjadi peningkatan nilai fertilitas sementara dari perlakuan 0,5ms 2x ke perlakuan 0,5 ms 4x, kemudian terjadi penurunan dan kenaikan nilainya kembali sejalan dengan bertambahnya nilai *Pulse length* dan *Pulse number*. Terlihat bahwa nilai fertilitas tertinggi terdapat pada perlakuan 0,5 ms 4x dan terendah pada perlakuan 0,5 ms 2x.

Untuk mengetahui pengaruh fertilitas sperma terhadap telur ikan mas, maka dilakukan analisa sidik ragam (Lampiran 5) dengan hasil seperti yang ditunjukkan pada Tabel 15 berikut ini.

Tabel 15. Hasil sidik ragam Fertilitas Sperma

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan Kombinasi	5	1.585,42	317,08	-	-	-
a. Pulse Length	1	187,07	187,07	7,25*	5,99	13,75
b. Pulse Number	2	1.055,35	527,67	20,45**	5,14	10,92
c. Interaksi PL dan PN	2	343	171,5	6,67*	5,14	10,92
2. Acak	6	343	25,8	-	-	-
3. TOTAL	11	1.740,32	-	-	-	-

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

* = berbeda nyata

Dari hasil perhitungan sidik ragam data fertilitas sperma, menunjukkan bahwa perlakuan jumlah kejutan (*Pulse number*) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap fertilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan nilai F hitung (20,45) > F Tabel 1% yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 . Demikian pula pemberian lama kejutan (*Pulse length*) serta interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap daya fertilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan nilai F hitung lama kejutan (*Pulse length*) (7,25) dan nilai interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* (6,64) > F Tabel 5% (5,14) dan < dari F Tabel 1% (10,92) yang berarti juga menerima H_1 dan menolak H_0 .

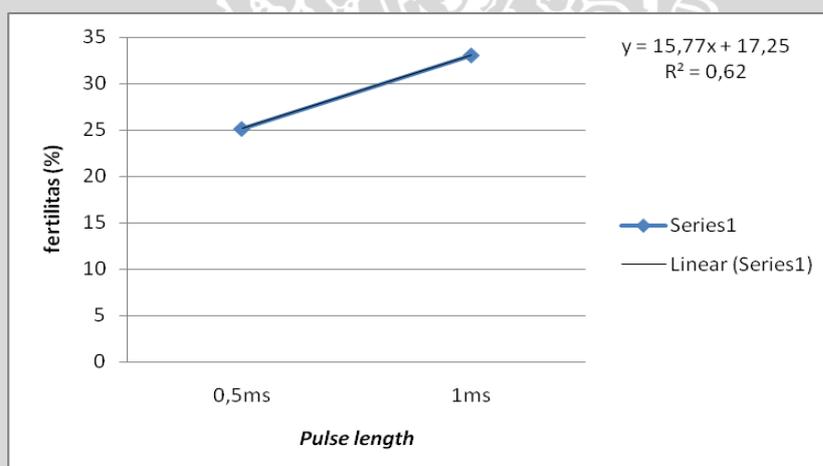
Selanjutnya dilakukan uji BNT (Lampiran 5) untuk mengetahui pengaruh pemberian lama kejutan (*Pulse length*) seperti yang tersaji pada Tabel 16.

Tabel 16. BNT *Pulse Length* terhadap Daya Fertilitas

Lama Kejutan	Rata-rata	Notasi
0,5 ms	25,14	a
1 ms	32,89	b

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Dari Tabel 16 diketahui bahwa pemberian lama kejutan (*Pulse length*) 1 ms lebih baik bila dibandingkan dengan 0,5 ms terhadap daya fertilitas. Dari perhitungan regresi didapatkan persamaan regresi linier, yaitu $y = 17,26 + 15,77x$ yang merupakan bentuk hubungan antara lama kejutan (*Pulse length*) dan daya fertilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*), seperti yang ditampilkan pada Gambar 32 di bawah ini.



Gambar 32. Grafik hubungan antara *Pulse length* dan fertilitas sperma

Dari Gambar 32 diketahui bahwa terjadi peningkatan nilai daya fertilitas dengan penambahan lama kejutan (*Pulse length*). Pemberian lama kejutan (*Pulse length*) 1 ms memberikan nilai daya fertilitas lebih tinggi daripada lama kejutan 0,5 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).

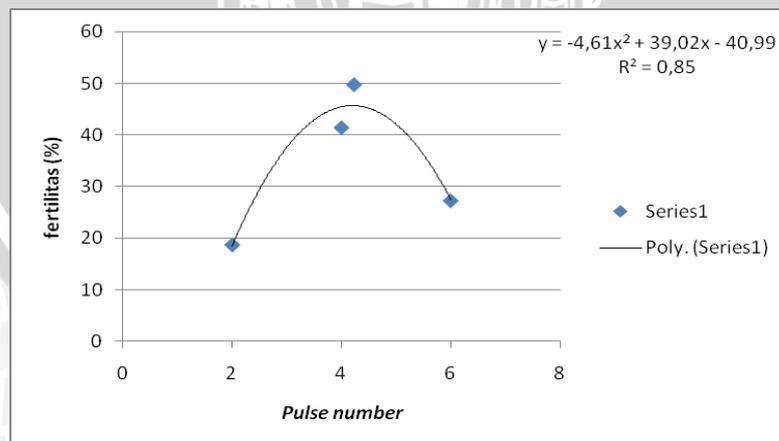
Kemudian dilakukan uji BNT untuk jumlah kejutan (*Pulse number*) untuk mengetahui pengaruh masing-masing perlakuan terhadap daya fertilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio*) pada Tabel 17.

Tabel 17. BNT *Pulse Number* terhadap Fertilitas sperma

Jumlah Kejutan	Rata-rata	Notasi
B1 = 2x	18,63	a
B3 = 6x	27,26	a
B2 = 4x	41,38	b

Keterangan = notasi sama berarti tidak berbeda

Dari Tabel uji BNT pada Tabel 17 dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik adalah jumlah kejutan (*Pulse number*) 4x dengan nilai 41,38% kemudian diikuti oleh 6x (27,26%) dan jumlah kejutan 2x (18,63%). Selanjutnya dilakukan uji regresi untuk mengetahui hubungan antara jumlah kejutan (*Pulse number*) dengan persentase fertilitas, dengan persamaan kuadratnya adalah $y = -40,99 + 39,02x - 4,61x^2$ dengan $R^2 = 0,85$ yang mempunyai titik puncak 49,66 pada jumlah kejutan (*Pulse number*) 4,23.



Gambar 33. Grafik hubungan antara *Pulse number* dan fertilitas sperma

Dari Gambar 33 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan nilai daya fertilitas sejalan dengan adanya peningkatan lama kejutan (*Pulse length*). Diketahui bahwa perlakuan jumlah kejutan (*Pulse number*) 4,23x memberikan nilai fertilitas tertinggi dan terendah pada jumlah kejutan 2x.

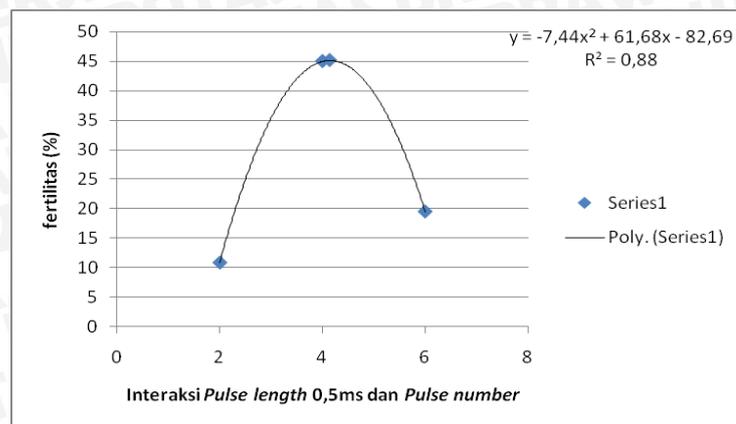
Kemudian dilakukan uji BNT Interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* (Lampiran 5) seperti yang terlihat pada Tabel 18 dan di bawah ini.

Tabel 18. Uji BNT Interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* terhadap fertilitas sperma

Lama Kejutan	Rata-rata	Notasi
0,5ms 2x	10,9	a
0,5ms 6x	19,54	ab
1ms 2x	26,36	bc
1ms 6x	34,9	cd
1ms 4x	37,77	cd
0,5ms 4x	44,9	d

Keterangan : notasi sama berarti tidak berbeda

Pada Tabel 18 dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik menggunakan lama kejutan 0,5 ms dan jumlah kejutan 4x dengan nilai 44,9%. Setelah itu dilakukan uji regresi untuk mengetahui hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan persentase fertilitas sperma, didapatkan persamaan kuadratnya adalah $y = -82,69 + 61,68x - 7,44x^2$ (untuk interaksi *Pulse length* 0,5 ms dan *Pulse number*) dengan $R^2 = 0,88$ yang mempunyai titik puncak 45,15% pada jumlah kejutan (*Pulse number*) 4,14 kali, sedangkan untuk interaksi *Pulse length* 1 ms dan *Pulse number* didapatkan tidak ada hubungan. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 34.



Gambar 34. Grafik hubungan antara Interaksi *Pulse length* 0,5ms dan *Pulse number* terhadap fertilitas

Dari gambar 34 dapat diketahui bahwa perlakuan 0,5 ms 4,14x memberikan nilai fertilitas tertinggi sebesar 45,15%. Kang *et al.*, (1999) menyatakan bahwa morfologi sperma yang dielektroporasi, tereduksi menjadi lebih tipis. Menurut Agarwall *et al.*, (2003), rusaknya membran sel akan meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga bahan-bahan yang semestinya tidak boleh melewati dapat secara bebas keluar masuk sel dan akhirnya integritas sel sperma terganggu.

Dari perhitungan diatas diketahui terjadi penurunan nilai fertilitas sperma perlakuan bila dibandingkan dengan sperma kontrol, rendahnya nilai fertilitas sperma banyak dipengaruhi dari kualitas sperma itu sendiri. Seperti diketahui bahwa terjadi penurunan pada nilai persentase motilitas dan viabilitas sperma sehingga secara tidak langsung juga mempengaruhi daya fertilitasnya juga. Sesuai dengan pernyataan Masrizal dan Efrizal (1997) bahwa salah satu permasalahan fertilisasi pada budidaya ikan air tawar adalah rendahnya tingkat fertilisasi dari spermatozoa di dalam air. Hal ini mengakibatkan banyaknya sel telur yang tidak terbuahi secara sempurna. Selanjutnya Hosken (1998), menyatakan bahwa keberhasilan pembuahan sangat tergantung pada kualitas dan kuantitas sperma.

Permasalahan lain adalah kurangnya ketersediaan cairan spermatozoa pada waktu pembuahan buatan. 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. Fertilisasi dapat didukung oleh kualitas spermatozoa yang baik.

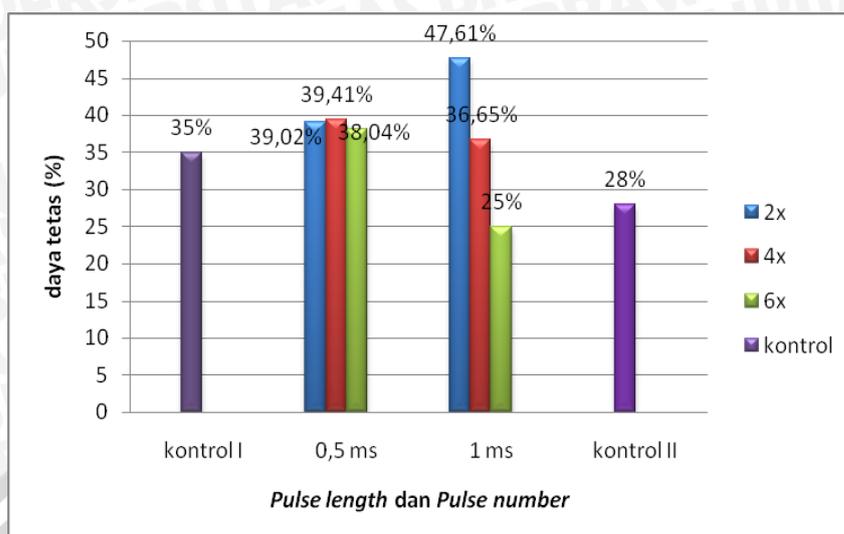
4.7 Daya Tetas Telur (*Hatching rate*)

Telur yang sudah terfertilisasi diamati perkembangannya sampai menetas selama ± 72 jam. Hasil daya tetas telur (*Hatching rate*) dari tiap perlakuan tertera pada Tabel 19 di bawah ini.

Tabel 19. Daya Tetas Telur (*Hatching rate*)

Perlakuan	Ulangan		Rerata (%)
	1	2	
Kontrol I	35	-	35
0,5 ms 2x	53,8	24,24	39,02
0,5 ms 4x	7,4	71,42	39,41
0,5 ms 6x	46,15	29,94	38,04
1 ms 2x	33,33	61,9	47,61
1 ms 4x	44,73	28,57	36,65
1 ms 6x	18,75	31,25	25
Kontrol II	28	-	28

Dari hasil perhitungan daya tetas telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) setelah difertilisasikan dengan sperma yang telah dielektroporasi dengan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) yang berbeda (Lampiran 6), menunjukkan nilai yang naik turun (Gambar 22). Diketahui bahwa perlakuan 1ms 2x memiliki nilai yang relatif tinggi (47,61%) sedangkan nilai terendah terdapat pada perlakuan 1ms 6x dengan nilai 25%.



Gambar 35. Histogram persentase *Hatching rate*

Dari Gambar 35 dapat diketahui bahwa nilai daya tetas tertinggi terdapat pada perlakuan 1 ms 2x sedangkan nilai terendah terdapat pada perlakuan 1 ms 6x. Dapat dilihat bahwa terjadi sedikit kenaikan pada perlakuan lama kejutan 0,5ms dan semakin naik dengan bertambahnya jumlah kejutan dan pada perlakuan lama kejutan 1ms semakin menurun dengan bertambahnya jumlah kejutan.

Kualitas telur dan kualitas air media inkubasi sangat menentukan keberhasilan proses penetasan telur. Kualitas telur yang baik dan didukung oleh kualitas air media yang memadai dapat membantu kelancaran pembelahan sel dan perkembangan telur untuk mencapai tahap akhir terbentuknya embrio ikan. Yatim (1990) dan Effendie (1997) menyatakan bahwa salah satu faktor kualitas air yang penting dalam memengaruhi pembelahan sel (penetasan telur) adalah suhu air medium.

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap daya tetas, maka dilakukan analisa sidik ragam. Dari hasil tersebut diketahui bahwa pemberian kejutan listrik dengan lama kejutan dan jumlah kejutan yang berbeda tidak berpengaruh terhadap daya tetas karena nilai F hitung dari masing-masing perlakuan kurang

dari F Tabel 5% yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1 . Hasil analisa sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 20 di bawah ini.

Tabel 20. Hasil Sidik Ragam *Hatching rate*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan Kombinasi	5	530,89	106,17	-	-	-
a. <i>Pulse Length</i> (PL)	1	17,33	17,33	0,025 ^{ns}	5,99	13,75
b. <i>Pulse Number</i> (PN)	2	279,23	139,5	0,20 ^{ns}	5,14	10,92
c. Interaksi PL dan PN	2	234,33	117,16	0,17 ^{ns}	5,14	10,92
2. Acak	6	4.131,17	688,52	-	-	-
3. TOTAL	11	4.662,06	-	-	-	-

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

* = berbeda nyata

Dari Tabel 20 dapat diketahui bahwa perlakuan *Pulse length*, *Pulse number* serta *interaksi Pulse length* dan *Pulse number* tidak berpengaruh nyata terhadap daya tetas dimana F hitung < FTabel 5 % yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1 .

Dari nilai diatas, 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).

Tipe telur ikan mas yang bersifat melekat (*adhesif*) kemungkinan besar sebagai satu faktor kualitas telur yang menyebabkan rendahnya derajat penetasan pada telur ikan mas. Sifat telur ikan mas yang melekat, membutuhkan tempat pelekatan atau substrat yang baik. Telur ikan mas yang bersifat *adhesif* yaitu melekat pada substrat atau antara telur yang satu dengan telur yang lain, sering mengakibatkan telur-telur tersebut tidak dapat menetas karena difusi oksigen menjadi berkurang (Sumantadinata, 1991). Kekurangan oksigen merupakan salah satu penyebab adanya kematian pada telur atau embrio yang sedang berkembang (Woynarovich dan Horvath, 1980). Sifat adhesif telur ikan mas disebabkan oleh adanya lapisan *gluco-protein* (Woynarovich dan Horvath, 1980) atau *globuline* (Hardjamulia, 1979) pada permukaan telur.

4.8 Kualitas Air

a. Suhu

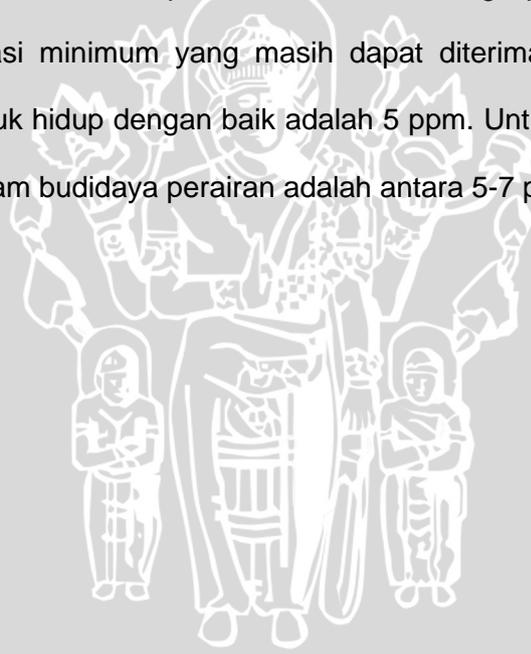
Selama masa inkubasi telur sampai menetas, dilakukan pengukuran suhu. Suhu dalam bak inkubasi berkisar antara 26-27⁰C. Pengukuran suhu dilakukan sebanyak 2 kali dalam sehari, yaitu pada pukul 06.00 dan 15.00 WIB. Pada masa inkubasi telur menggunakan bak inkubator yang dipasang heater air sebanyak 3 buah, supaya suhu merata dan stabil. Suhu air yang baik berkisar antara 20-25⁰C (Anonymous, 20010d). Suhu mempengaruhi aktifitas ikan, seperti pernapasan, pertumbuhan dan reproduksi. Kecepatan penetasan sangat tergantung pada suhu air. Pada suhu 23 – 26⁰ C telur ikan mas menetas dalam 2 hari (rata-rata 48 jam). Sedangkan pada suhu 27 – 30⁰ C, telur menetas dalam 3 hari (rata-rata 72 jam) (Anonymous, 2010e).

b. pH

Derajat keasaman (pH) pada bak inkubator selama masa inkubasi yaitu 7,8. Keasaman air (pH) yang baik adalah antara 7-8. Sedang titik batas kematian organisme air terhadap pH adalah pH 4 dan pH 11 (Anonymous, 20010d). Menurut Gusrina (2008) pH perairan dipakai sebagai salah satu untuk menyatakan baik buruknya suatu perairan.

c. Oksigen Terlarut

Nilai oksigen terlarut pada air media inkubasi telur yaitu sebesar 6 ppm. Biota air membutuhkan oksigen guna pembakaran bahan bakarnya (makanan) untuk menghasilkan aktivitas, seperti aktivitas berenang, pertumbuhan dan reproduksi. Konsentrasi minimum yang masih dapat diterima sebagian besar biota air budidaya untuk hidup dengan baik adalah 5 ppm. Untuk itu, konsentrasi oksigen yang baik dalam budidaya perairan adalah antara 5-7 ppm (Kordi, 2007).



5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- Transfer gen GFP dengan metode elektroporasi dapat bereksresi pada sperma dengan nilai intensitas tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 4x (3600 arbitrary), embrio hasil fertilisasi dengan nilai intensitas tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 4x (4000 arbitrary) dan larva setelah menetas dengan nilai intensitas tertinggi pada perlakuan 1ms 4x (bagian kepala 4000 arbitrary, perut 3400 arbitrary dan ekor 4000 arbitrary)
- Pemberian tegangan 40 volt dengan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) yang berbeda berpengaruh terhadap integrasi GFP pada inti sperma
 - Hubungan antara *Pulse length* dengan integrasi GFP $y = 54,11 - 44,38x$
 - Hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan integrasi GFP $y = -84,06 + 81,45x - 11,24x^2$ (untuk 0,5 ms) sedangkan untuk 1 ms tidak ada hubungan
- Berdasarkan hasil analisa regresi, persentase integrasi GFP pada inti sperma tertinggi pada lama kejutan 0,5 ms (31,92%) dengan jumlah kejutan 3,62 kali (63,23%)
- Pemberian tegangan 40 volt dengan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) yang berbeda berpengaruh terhadap motilitas sperma
 - Hubungan antara *Pulse length* dengan motilitas $y = 39,16 + 30x$
 - Hubungan antara *Pulse number* dengan motilitas $y = 30,01 + 20,31x - 2,65x^2$
 - Hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan motilitas

$y = 12,5 + 29,38x - 4,06x^2$ (untuk 0,5 ms) sedangkan untuk 1 ms tidak ada hubungan

- Pemberian tegangan 40 volt dengan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) yang berbeda berpengaruh terhadap mortalitas sperma

- Hubungan antara *Pulse length* dengan mortalitas $y = -61,55 + 148,13x$

- Hubungan antara *Pulse number* dengan mortalitas

$$y = 67,51 - 15,175x + 2,29x^2$$

- Pemberian tegangan 40 volt dengan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) yang berbeda berpengaruh terhadap fertilitas sperma

- Hubungan antara *Pulse length* dengan fertilitas $y = 17,26 + 15,77x$

- Hubungan antara *Pulse number* dengan fertilitas $y = -40,99 + 39,02x - 4,61x^2$

- Hubungan antara interaksi *Pulse length* dan *Pulse number* dengan fertilitas

$y = -82,69 + 61,68x - 7,44x^2$ (untuk 0,5 ms) sedangkan untuk 1 ms tidak ada hubungan

- Kisaran kualitas air pada media inkubator masih berada pada kisaran normal yaitu suhu 26-27°C, pH 7,8 dan oksigen terlarut 6,8 ppm

5.2 Saran

- Proses pembuatan ikan transgenik berdasarkan metode elektroporasi menggunakan tegangan listrik 40 volt, lama kejutan 0,5ms dan jumlah kejutan 4x agar didapatkan nilai motilitas, fertilitas dan integrasi GFP pada inti sperma yang tinggi sebaiknya dengan konsentrasi DNA (GFP) 60ng
- Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui lamanya GFP dapat stabil dalam larva ikan mas

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2004. Optimizing electroporation parameters. Diakses dari <http://www.biocompare.com>
- _____. 2005. siPORT™ siRNA Electroporation Buffer. Diakses dari www.ambion.com
- _____. 2006. Gene Pulser Xcell Electroporation System. Diakses dari www.google.com
- _____. 2007a. How does a confocal microscope work? . Diakses dari : www.google.com
- _____. 2007b. pengamatan Histologi reproduksi, Preservasi dan Uji Motilitas . Diakses dari : www.google.com
- _____. 2009a. Teknik Isolasi Gen pada Bioluminescence. Diakses dari : www.google.com
- _____. 2009c. pembentukan spermatozoa. Diakses dari : <http://kambing.ui.ac.id>
- _____. 2009d. Tegangan listrik. Diakses dari : http://id.wikipedia.org/wiki/Tegangan_listrik
- _____. 2009e. How Electroporation Work. Diakses dari : <http://inoviobiomedical.org>
- _____. 2009f. Peraih Hadiah Nobel Kimia 2008- Untuk penemuan dan pengembangan GFP (*Green Fluorescent Protein*) – Protein Berfluoresensi Hijau. Diakses dari : www.google.com
- _____. 2009g. Promotor. Diakses dari : <http://en.wikipedia.org/wiki/Promoter>
- _____. 2009h. Mikroskop. Diakses dari : www.google.com
- _____. 2009i. Confocal Laser Scanning Microscopy. Diakses dari : http://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_laser_scanning_microscopy
- _____. 2009j. Propidium Iodide. Diakses dari : www.wikipedia.org
- _____. 2009k. 537059 Propidium Iodide. Diakses dari : www.google.com
- _____. 2009l. Prinsip Dasar Perancangan Percobaan. Diakses dari : www.WordPress
- _____. 2009m. Pulse Agile Electroporation . Diakses dari : www.google.com

- _____ . 2010a. Larutan Buffer/Penyangga. Diakses dari : www.bimbelSMES.com
- _____ . 2010b. 10008351 Propidium Iodide Solution. Diakses dari : <http://www.caymanchem.com>
- _____ . 2010c. 10008351 Electroporation (Electroporation). Diakses dari : <http://www.ghostlovers.com.au/electroporation.htm>.
- _____ . 2010d. Budidaya Ikan Mas. Diakses dari : www.iptek.net.id
- _____ . 2010e. Budidaya Ikan Mas - Penetasan telur ikan mas. Diakses dari : www.google.com
- _____ . 2010f. Definisi Mortalitas. Diakses dari : www.google.com
- _____ . 2011. Inverted microscope. Diakses dari : <http://www.nikoninstruments.com/Information-Center/Inverted-Microscope>
- Afandi, R. & Tang, U.M. 2000. Biologi Reproduksi Ikan. Laporan. Pekanbaru: Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan Perairan.
- Afriantini, R., T.I Yusuf, O. Indah. 2005. Kaji banding Dua Teknik Pengemasan Menggunakan Tiga Macam Pengencer untuk Pembekuan semen Sapi *Friesien Holstein* (FH). Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2005 Halaman 366-376
- Alimuddin, MH. Fariduddin Ath-thar, Lola Irma Purwanti, Odang Carman. 2009. Promoter β -actin Ikan Medaka (*Oryzias latipes*) dapat digunakan untuk Membuat Ikan Lele dan Ikan Mas Transgenik. Diakses dari : www.google.com
- Arie, U. 2008. Budidaya Ikan Mas – Sperma Ikan (Mas). Diakses dari <http://solusiikanmas.blogspot.com>
- Assubuki, 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>
- Baibakov, B., Lyn Gauthier, Prue Talbot, Tracy L. Rankin and Jurrien Dean. 2007. Sperm Binding to the Zona Pellucida is not Sufficient to Induce Acrosome Exocytosis. Research Article. 933-943. Diakses dari : www.google.com
- Baynes, S.M and Scott A.P. 1987. Cryopreservation of Rainbow Trout Spermatozoa : the Influence of Sperm Quality, Egg Quality and Extender Composition on Post-Thaw Fertility. *Aquaculture* 66, 53-67. Diakses dari : <http://books.google.co.id/books>

- 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
- Billiard, R., J. Cosson G Perchee and O. Linhart, 1995. *Biology of Sperm and Artificial Reproduction in Carp*. *Aquaculture* 139. halaman 95-112
- Cahyono. 2000. *Budidaya Ikan Air Tawar*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Halaman 28-36.
- Catanella. 2001. *Quantitative Study of Electroporation – Mediated Molecular Uptake and Cell Viability*. *Biophysical Journal* Volume 80 February 2001 halaman 755–764
- Chen, G dan Hongbao Ma. 2005. *Gene Transfer Technique*. Diakses dari : <http://www.sciencepub.org/nature/0301/03-mahongbao.pdf>.
- Clark, Jim. 2010. *Larutan Penyangga*. Diakses dari : www.chem-is-try.org
- Cubitt ,A.B., Heim ,R., Adams ,S.R., Boyd ,A.E., Gross ,L.A. and Tsien ,R.Y. 1995. *Trends Biochem. Sci.*, 20, 448–455
- Dunham. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology*. Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University. Alabama. USA. Halaman 161-165
- Effendie, M.I, 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama, Yogyakarta. 50–71.
- Fardana, A.R. 2008. *Laporan Praktikum Rangkaian Listrik Tegangan, Arus dan Hambatan*. Diakses dari : <http://www.norture.com>
- Farid. 2007. *Mikroskop Pemindai Berteknologi Laser di Unibraw*. Diakses dari : www.google.com
- Fariduddin, Komar Sumantadinata,, Alimuddin dan Rudhy Gustiano. 2009. *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. Diakses dari : www.google.com
- Fujaya. 2004. *Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan*. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta. 179 hal
- 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 TAL, Richardson L, Brown CR, Moor RM. 1989. *Characterization of Protein Secreted by Sheep Oviduct Epithelial Cells and their Function in Embryonic Development*. *Development* 106, 303-312

- Garner and Lawrence 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 87-145
- Gong Z. 2004. Fish Development and Genetics the Zebrafish and Medaka Models. World Scientific. Singapore. 675 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
- Harvey, B.J and W.S Hoar, 1979. The Theory and Practice of Induced Breeding in Fish. IDRC-2le, Ottawa. Nalaman 1-48
- Hackett. 1993. Molecular Fish Transgenic. *Jurnal Biotechnology*.
- Handarini. 2001. Ternak Transgenik: Prosedur, Bioetika dan Keamanannya. Diakses dari : <http://www.rudyct.com/PPS702-ipb/02201/ristika.htm>
- _____. 2004. Produksi Ternak Transgenik sebagai Upaya Peningkatan Mutu Genetik Ternak. Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara. Diakses dari : <http://library.usu.ac.id>
- Hardjamulia A, 1979. Budidaya Perikanan. Budidaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.), Ikan Tawes (*Punctius javanicus Blkr.*) dan Ikan Nilem (*Osteoschilus hasselti*). SUPM Bogor. Badan Pendidikan Latihan Pertanian dan Penyuluhan Pertanian, Departemen Pertanian. 1-7.
- Hidayaturrahmah. 2007. Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa. Progam 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 and 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.
- Hosken, J.D. 1998. Sperm fertility and skewed paternity during sperm competition in the Australian long eared but. *J. Of Zoology* 245: 93-100.
- Hovath L and L. Orban. 1995. Genome and Gene Manipulation in the Common carp. *Aquaculture* 129 : pp 157-181

- Isnaini, N. 2000. Kualitas Seman Ayam Arab dalam Pengenceran NaCl Fisiologis dan Ringer's pada Suhu Kamar. Habitat. Volume 11, No 113, halaman 233-238
- Jeyendran RS, Zaneveld LJD. 1986. Instruction influences for Hypoosmotic Swelling (HOS) Test. Short Course Reproduction / Andrology and Non Hormonal contraception. Chicago.
- Jordan ET, Collins M, Terefe J, Ugozzoli L, Rubio T (2008). Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells. J. Biomol. Technol. 19(5): 328-334.
- Jusuf. 2010. Regulasi Ekspresi Gen. Jurusan Biologi FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Diakses dari : www.google.com
- Kang, H. J, Goro Yoshizaki, Osamu Homma, Charlos, A, Strusman, Fumio Takasima. 1999. Effect of Osmotic Differential on the Efficiency of gene Transfer by Electroporation Fish Spermatozoa. Aquaculture 173, page 297-307
- Karim, M. Y. 2002. Upaya Peningkatan Produksi Akuakultur Melalui Aplikasi Teknologi Transgenik (Suatu Kajian Filsafat Ilmu). Diakses dari : www.google.com
- Karunasagar, Iddy, Indrani Karunasagar dan alan Reilly. 1999. Aquaculture and Biotechnology. Science Publisher, Inc. United States of America. Halaman 91-100
- Kordi, K., M. Guhufran., Andi Baso Tacung. 2007. Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta
- Kruger, J.C.D.W., G.L.Smith, Van Vuren and J.T. Ferrira. 1983. Sperm Motility in Fishes : Effect of Temperature and pH. J. Fish Biol. 50 : 1309-1328. Diakses dari : <http://digilib.its.ac.id>
- Lavitrano, M., Marco Busnelli, Maria Grazia Cerrito, RobertoGiovannoni, Stefano Manzini and Alesia Vargiolu. 2006. Sperm Mediated Gene Transfer. Diakses dari : www.publish.cairo.au
- Linhart , Y.B. 1991. Disease, parasitism, and herbivory; multi-dimensional challenges in plant evolution. Trends in Biology and Evol., 6:392-396.
- Masrizal dan Efrizal. 1997. Pengaruh Rasio Pengenceran Mani terhadap Fertilisasi Sperma dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (Cyprinus carpio L). Fisheries Journal Garing 6: 1-9.
- Mersereau, M.; Pazour, G.J. and Das, A. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Gene, 1990, vol. 90, no. 1, p. 149-151.

- Miklavc, D. and Tadej K. 2009. Electroporation for Electrochemotherapy and Gene Therapy. Diakses dari <http://ljk.fe.uni-lj.si/pdfs/beme2004.pdf>.
- Mukhlas. 2009. Hipofisa dan Ovaprim. Diakses dari : <http://mukhlasmuthiullah.blogspot.com>
- Nuraini, Tuti. 2009. Fertilisasi dan Kontrol Reproduksi. Diakses dari : <http://staff.ui.ac.id>
- Nurman. 1998. Pengaruh penyuntikan Ovaprim terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell). Fisheries Journal Garing 7: 34-42
- Paisal. 2008. Pemeriksaan Sperma. Diakses dari : <http://www.wartamedika.com>
- Partodihardjo, S. 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya. Jakarta
- Pavlin, M., Mas`a Kandus`er, Metej Rebers`ek, Gorazd Pucihar, Francis X. Hart, Ratko Magjarevic` dan Damijan Miklavc` ic`. 2005. Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell suspension. Biophysical Journal Volume 88 June 2005 4378-4390
- Pinkert, C.A. 1994. Transgenic Animal Technology. Academic Press, Inc., New York. pp : 297-313.
- Plouidy, M.G and Billiard, R, 1982. The Chemical Composition of Companion Fluids of the Gametes in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L). proceeding the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Centre for agriculture Publishing and Documentation. Wageningen, Netherland. Halaman 134
- Prasher, D.C, M. Chalfie. Y.Tu, G. Euskirchen. 1995. Green Fluorescent Protein as a marker for Gene Expression. Science 263 : 802 – 805
- Prausnitz, M. R.,Becky S. Lau,** Christina D. Milano,*4 Stewart Conner,§ Robert Langer,** and James C. Weaver. 1993. A Quantitative Study of Electroporation Showing a Plateau in Net Molecular Transport. Biophysical Journal Volume 65 July 1993 414-422
- 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
- Quitschket, Wolfgang W., Ze-Yu Lin, Liliana DePonti-Zilli, and Bruce M. Paterson. 1988. The β -actin Promoter. High Levels Of Transcription Depend Upon A Ccaat Binding Factor. From the Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. Diakses dari : www.google.com
- Rambabu, K.M., S Hari Narayana Rao dan N madhusudhana Rao. 2005. Efficient Expression of Transgenesis in Adult Zebrafish by Electroporation. Diakses dari : <http://www.biomedcentral.com>

- Rankin, T. L., Coleman, J. S., Epifano, O., Hoodbhoy, T., Turner, S. G., Castle, P. E., Lee, E., Gore-Langton, R. and Dean, J. (2003). Fertility and Taxonspecific Sperm Binding Persist After Replacement of Mouse 'Sperm Receptors' with Human Homologues. *Dev. Cell* 5, 33-43.
- 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.
- Rieka. 2009. Spermatozoa. Diakses dari : http://rieka-bio.blogspot.com/2009_05_01_archive.html
- Robertis ED, Robertis EM. 1979. Cell and Moleculer Biology. Philadelphia: Saydesr College.
- Rols, M.P., Justin T. 1998. Electropemeabilization of Mammalian Cells to Macromolecules : Control by Pulse Duration. *Biophysical Journal* Volume 75 spetember 1998 1415-1423
- Rustidja. 1985. Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan. Fisheries Project Unibraw. Malang.
- _____. 1995. Gynogenesis Meiosis. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Halamn 4-16. Halaman 1-10
- _____. 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
- Saad, A. and R. Billard. 1987. Spermatozoa Production and Volume of Semen Collected After Hormonal Stimulation in The Carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 65 : 67 – 77. Diakses dari : www.google.com
- Saanain, H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Penerit Binacipta. Bandung. 256 halaman
- Saili, T. 1999. Efektivitas Penggunaan Albumen sebagai Medium Separasi dalam Upaya Mengubah Rasio Alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi. Thesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Santoso, B. 1993. Seri budidaya ikan mas. Penerbit kanisius. Yogyakarta. Halaman 14-17

- Sawayama, A. 2006. Membuat Vektor Ekspresi untuk Mendapatkan Ekspresi Gen yang Tinggi dengan Memodifikasi 3'UTR. Thesis. Tokyo University of Marine Science and Technology. Jepang
- Sharma KK, Bhatnagar-Mathur P, Thorpe TA (2005). Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 41: 102-112.
- Shen, Wen-Jun and Forde, Brian G. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium spp.* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, vol. 17, no. 20, p. 8385.
- Shimogori T, Ogawa M. 2008. Gene Application with in Utero Electroporation in Mouse Embryonic Brain. *Dev Growth Differ* 50, 499-506
- Sin FYT, Bartley AL, Walker SP, Sin IL, Hawke L, Hopkins CL. 1993. Gene transfer in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by Electroporating Sperm in the Presence of pRSV-lacZ DNA. *Aquaculture* 117, halaman 57-69. Diakses dari : <http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress/1994/sin.pdf>.
- Smith K, Spadafora C. 2005. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *BioEssays* 2005;27:551–562.
- Soehartojo H. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya.
- Soelistyowati. 2003. Diktat Kuliah Rancangan Percobaan Penelitian. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 4-5
- Soeparna. 1980. Pengantar Spermatologi, Masalah Khusus. Fakultas Perikanan. IPB. Bogor
- 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
- Sucipto, Adi. 2008. Pengembangan Ikan Transgenik (sebuah pengantar) . Diakses dari : <http://www.naksara.net>
- Suharsono. 2010. Struktur dan Ekspresi Gen. Jurusan Biologi FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Diakses dari : www.google.com
- Sumantadinata, K., 1981. Pengembangan Ikan-ikan Peliharaan di Indonesia. Sastrahudaya, Jakarta. Halaman 1-105
- Sumantadinata K, 1991. Teknologi Produksi Benih Unggul Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). Fenotip Generasi Pertama Beberapa Strain Ikan Mas Hasil Pemurnian dengan Metode Gynogenesis. Fakultas Perikanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 47.
- Suquest M, Billard. R, Cosson J., Dorange G., Chauvaud I., Mugnier C., & Fauvel L., 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): A

Comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic living Resources*. 7: 283 -294.

Suyadi dan N. Isnaini. 2003. Pemanfaatan Sari Buah Pisang sebagai Bahan Pengencer Semen Kambing. *Jurnal Ilmu Hayati* Vol 15 No 1 halaman 5-10

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

Toelihere, M. R. 1981. Inseminasi buatan pada Ternak Angkasa, Bandung. Halaman 1-122.

_____. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung

Tortora, G. 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 Journal* Volume 56 : 281-284

Tsong, T.Y. 1991. Electroporation of Cell Membrane. *Biophysical Journal*. Volume 60 halaman 297-306

Volckaert, F.A., Hellemans B.A, Galbuzera P and Oliver F. 1994. Replication Expression and Fate Foreign DNA during Embryonic and Larva Development of the African Catfish *Clarias Gariepinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (2) 57-69

Wahyu, 2009. Motilitas dan Viabilitas Sperma Ikan. Diakses dari : www.google.com

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

Weiss, Natascha., Wolfgang Bielke dan Peter Hahn. 2007. Using Eppendorf's Multiporator to Introduce siRNA into Jurkat Cells. Diakses dari : www.eppendorf.com

Winarsih, W.H. 1996. Pengaruh pembekuan Spermatozoa dengan Nitrogen Cair terhadap Kualitas dan daya Tetas Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya. 120 halaman.

Wink, Michael. 2002. *An introduction to Molecular Biotechnology*. Halaman 252-264

Woyanovich E, dan Horvath L, 1980. *The Artificial Propagation of Warmwater Finfishes. A Manual for Extension*. FAO. 65–72.

Yatim W, 1990. Reproduksi dan Embriologi. Penerbit Tarsito, Bandung. 17–18.

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

Yu, Q., J. Kuo and C. Tang. 2001. Using Confocal Laser Scanning Microscopy to Measure Apoplastic pH Change in Roots of *Lupinus angustifolius* L. in Response to High pH. *Annals of Botany* 87: 47-52. Diakses dari : <http://www.idealibrary.com>

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

Zimmermann, U. 1982. Electric Field-Mediated Fusion and Related Electrical Phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta* 694, 227-277

