

**EKSPRESI HORMON 17- β ESTRADIOL GONAD
IKAN TAWES (*Puntius javanicus*) DI SUNGAI SURABAYA DAN
KALIMAS SURABAYA**

SKRIPSI

**Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan
Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan**

OLEH :

RISMA NORA PUJITYASTUTI

NIM. 105080100111011

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

**EKSPRESI HORMON 17- β ESTRADIOL GONAD
IKAN TAWES (*Puntius javanicus*) DI SUNGAI SURABAYA DAN
KALIMAS SURABAYA**

SKRIPSI

**Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan
Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan**

**Skrripsi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

OLEH :

RISMA NORA PUJITYASTUTI

NIM. 105080100111011



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

SKRIPSI
EKSPRESI HORMON 17- β ESTRADIOL GONAD
IKAN TAWES (*Puntius javanicus*) DI SUNGAI SURABAYA DAN
KALIMAS SURABAYA

RISMA NORA PUJITYASTUTI
NIM. 105080100111011

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 14 Juli 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I,

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I,

Dr. Asus Meizar S.H., S.Pi, MP

Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D

NIP. 19720529 200312 1 001

NIP. 19610523 198703 2 003

Tanggal:

Tanggal:

Dosen Penguji II,

Dosen Pembimbing II,

Dr. Ir. Umi Zakiyah, M.Si

Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si

NIP. 19610303 198602 2 001

NIP. 19730702 200501 2 001

Tanggal:

Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr.Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal:

Penelitian ini berjalan atas dukungan dari
Payung Riset

Atas Nama: Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, PhD.

yang disponsori oleh:

Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
dan BOPTN
Tahun anggaran
2013 - 2014

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam laporan skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

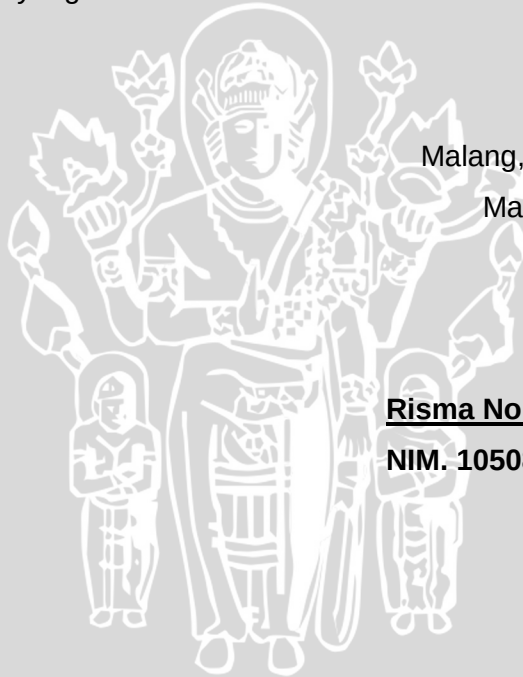
Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan laporan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 10 Juli 2014

Mahasiswa

Risma Nora Pujityastuti

NIM. 105080100111011



KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT, karena berkat rahmat dan ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Skripsi yang berjudul **“Ekspresi Hormon 17- β Estradiol Gonad Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) di Sungai Surabaya dan Kalimas Surabaya”**. Laporan Skripsi ini disusun sebagai suatu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Laporan Skripsi ini saya hadirkan dengan harapan agar dapat dijadikan pegangan belajar mengenai dunia perikanan, sekaligus menambah khasanah keilmuaan bagi pembaca terutama untuk mempelajari tentang kondisi hormon reproduksi ikan tawes di perairan yang tercemar. Sehingga diharapkan penelitian ini dapat dilanjutkan oleh peneliti yang lain.

Adapun ucapan terima kasih tak lupa saya persembahkan kepada pihak-pihak yang telah ikut serta dalam menyelesaikan Laporan Skripsi ini, diantaranya:

1. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang yang telah memberikan fasilitas kuliah untuk dapat meunjang proses kegiatan Skripsi ini.
2. Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA. Ph.D selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, semangat, saran serta nasehat yang telah diberikan.
3. Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, saran serta nasehat yang telah diberikan.

Dalam penyusunan laporan ini penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, oleh sebab itu penulis menerima segala kritik dan saran yang membangun agar laporan ini dapat bermanfaat. Semoga laporan ini dapat menambah pengetahuan dan bermanfaat bagi yang membacanya. Amin

Malang, 10 Juli 2014

Penulis

LEMBAR PERSEMBAHAN

Saya menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada:

1. Allah SWT, yang telah memberikan segala nikmat dan kemudahan serta kekuatan hati yang luar biasa kepada saya selama ini.
2. Ayahanda Rimun, Spd. dan Ibunda Sri Hastuti, Spd. tercinta serta adik Rirul Yora Dyastuti dan Riski Dela Ningrum yang saya sayangi, terimakasih atas semangat, bantuan dan pengorbanan baik moril maupun materiil serta doanya yang selalu mengiringi setiap langkah detak jantung saya menuju ke kesuksesan, khususnya dalam penyelesaian dan penyusunan laporan ini.
3. Ibu Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D selaku dosen pembimbing I dan Dr. Yuni Kilawati S.Pi, M.Si selaku dosen pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, nasehat, saran dan arahan yang sistematis dalam menyelesaikan laporan dengan baik, sabar dan ikhlas.
4. Dr. Asus Meizar S.H., S.Pi, MP dan Dr. Ir. Umi Zakiyah, M.Si selaku Dosen Penguji yang memberikan kesempatan dalam memperbaiki laporan skripsi.
5. Mbak Choirunil Chotimah, Ssi sebagai teknisi dari Laboratorium Molekuler dan Seluler (LSIH) Brawijaya yang telah banyak membantu dalam berlangsungnya proses penelitian di laboratorium dan juga Bapak Lasmijan, SE dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Brawijaya yang telah membantu pembuatan preparat histologi gonad ikan Tawes.
6. Mbak Shobikhuliatul Jannah Juanda dan Mas Attabik Mukhammad Amrillah yang dengan sabar telah membimbing dan memberikan pengarahan.
7. Bayu Hendra Putranto sebagai patner dalam payung riset penelitian awal hingga akhir terselesaikannya skripsi ini.
8. Bayu Dwi Putra, Nada, Nevi, Habiba, Wk dan Qusnul yang telah banyak membantu dan memberikan semangat, dukungan serta doanya. Terimakasih banyak, semoga Allah SWT selalu membalas kebaikan kalian.
9. Teman-teman terdekat Mahanani, Talita, Rica, Nada, Oki, Sogleng, Aga, terimakasih untuk semangat dan dukungannya, semoga kesuksesan selalu menyertai kita semua.
10. Untuk seseorang yang selalu menjadi penyemangat, motivasi dan inspirasi saya, terimakasih banyak untuk semuanya.
11. Sahabat serta teman-teman MSP'10 seperjuangan yang selalu memberikan hiburan dan saling melengkapi keadaan.

RINGKASAN

Risma Nora. Ekspresi Hormon 17- β Estradiol pada Gonad Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) di Sungai Surabaya dan Kalimas Surabaya. (Dibawah bimbingan **Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D** dan **Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si**).

Kondisi sungai di hilir mengalami pencemaran paling berat karena merupakan tempat penampungan buangan dari berbagai macam aktivitas manusia. Tingginya pencemaran yang terjadi di sungai Surabaya dan sungai Kalimas berasal dari banyaknya pabrik dan pemukiman penduduk di sekitar sungai. Sungai Surabaya mempunyai fungsi pokok untuk menyediakan bahan baku air minum (PDAM) bagi masyarakat kota dan juga sebagai sumber kehidupan berbagai jenis biota sungai. Fungsi pokok sungai Kalimas untuk drainase kota, kegiatan perikanan, peternakan, serta mengalir taman. Sementara itu kualitasnya cenderung mengalami penurunan (Masduqi, 2006). Pengukuran kualitas air yang dipantau Jasa Tirta pada bulan Maret 2014 menunjukkan nilai TSS yang tinggi pada sungai Kalimas Surabaya sekitar 676,7 mg/l. COD 40,68 mg/l. dan BOD 6,93 mg/l sedangkan pada sungai Surabaya TSS 176 mg/l. COD 21,19 mg/l dan BOD 3,28 mg/l. Hasil penelitian Juanda (2013), kadar estrogen di air sungai dengan menggunakan metode ELISA didapatkan hasil yang sangat tinggi pada kedua sungai yaitu 100 pg/ml. Menurut PP No.82 tahun 2001 sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya dikatakan "tercemar" kadar limbah organik dan logam berat yang melebihi ambang batas baku mutu kualitas air.

Kontaminan lingkungan dari aktivitas estrogenik (berhubungan dengan hormon estrogen) baru-baru ini mendapat perhatian banyak pihak karena memiliki efek potensial yang dapat mengganggu reproduksi manusia dan satwa liar. Beberapa studi menunjukkan bahwa produk rumah tangga seperti deterjen, plastik, pestisida, obat-obatan serta senyawa alami dan limbah industri yang mengandung bahan kimia dengan aktivitas estrogenik dapat mengkontaminasi lingkungan. Bahan kimia ini dapat masuk ke dalam tubuh menjadi penyakit dan menimbulkan masalah pada reproduksi ikan jantan maupun betina terutama merusak hormon dan menyebabkan kelainan perkembangan pada sistem endokrin ikan. Bentuk hormon estrogen dalam tubuh hewan betina berupa estron, 17- β estradiol dan estriol, namun yang paling sering dijumpai dengan jumlah yang cukup tinggi dan paling poten dalam tubuh adalah 17- β estradiol. Estradiol berperan dalam proses vitelogenesis pada ovarium (Anwar, 2005).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat dan mengetahui nilai intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) di sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).

Metode yang digunakan adalah deskriptif, yaitu menggambarkan keadaan mengenai status suatu gejala yang ada di alam menurut apa adanya dengan cara melakukan analisa laboratorium pada saat penelitian dilaksanakan. Pengambilan sampel ikan dilakukan di sungai Surabaya dan sungai Kalimas. Preparasi histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK-UB dan pengamatan ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) di Laboratorium LSIH-UB.

Hasil dari penelitian ini dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscop* (CLSM) yang merupakan salah satu teknologi rancangan modern pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (IPTEK), dapat digunakan untuk melihat ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius*

javanicus). Ditunjukkan dengan adanya pendaran warna merah pada specimen gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*). Pendaran warna merah menunjukan bahwa protein estradiolnya terekspresi. Nilai rata-rata intensitas ekspresi hormon 17- β estradiol gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina di sungai Surabaya, Kalimas dan kontrol didapatkan hasil 3336,74; 2817,39; dan 2478,93 *intensity*/ μ m. Hasil analisis statistik dengan uji BNT 5% diketahui bahwa, intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol pada ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina sungai Surabaya berbeda nyata dengan ikan kontrol, sedangkan di sungai Kalimas dianggap tidak berbeda nyata dengan ikan kontrol sehingga dapat dikatakan ikan tawes di sungai Surabaya mempunyai intensitas rata-rata hormon 17- β estradiol yang tinggi. Pada gonad ikan tawes jantan nilai rata-rata intensitas ekspresi hormon 17- β estradiol di sungai Surabaya, sungai Kalimas dan kontrol didapatkan hasil 2170,78; 1948,86; dan 583,58 *intensity*/ μ m. Hasil analisis statistik dengan uji BNT 5% diketahui bahwa, intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol pada ikan tawes jantan sungai Surabaya dan di sungai Kalimas berbeda nyata dengan ikan kontrol sehingga dapat dikatakan ikan di sungai Surabaya dan di sungai Kalimas mempunyai intensitas rata-rata hormon 17- β estradiol yang tinggi.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSEMBAHAN	vi
RINGKASAN	vii
HALAMAN DAFTAR ISI	xi
HALAMAN DAFTAR TABEL	xii
HALAMAN DAFTAR GAMBAR	xiii
HALAMAN DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Kegunaan	4
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Ikan.....	6
2.1.1 Klasifikasi Ikan Tawes	6
2.1.2 Morfologi dan Habitat Ikan Tawes.	6
2.1.3 Tingkat Kematangan Gonad dan Indeks Kematangan Gonad. ...	7
2.2 Sistem Endokrin Ikan.	9
2.2.1 Hormon.	9
2.2.2 Hormon Estradiol.....	11
2.3 Mekanisme Pencemaran terhadap Perubahan Hormon Estradiol.	13
2.4 Gangguan Sistem Endokrin.	15
2.5 Olympus Fluoview FV 1000 (CLSM).	16
2.5.1 Spesifikasi <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM).....	18
A. Prinsip.	18
B. Instrumen.	18
2.5.2 Fluorescence.....	19
2.5.3 Keunggulan dan Kelemahan Microscop Confocal.....	20
2.6 Pengukuran Kualitas Air	20
2.6.1 Parameter Fisika.	20
A.Suhu.....	20
B. Kecepatan Arus.....	21
2.6.2 Parameter Kimia.....	22
A. Derajat Keasaman (pH).....	22
B. Oksigen Terlarut (DO).	23
C. Total Bahan Organik (TOM).	24
3. MATERI DAN METODE.	25
3.1 Materi Penelitian	25
3.2 Alat dan Bahan	25
3.3 Metode Penelitian	25

3.3.1 Data Primer	26
a. Observasi.....	26
b. Wawancara.....	26
c. Partisipasi Aktif.....	26
3.3.2 Data Sekunder.....	27
3.4 Tempat Penelitian	27
3.5 Prosedur Penelitian	27
3.5.1 Pengambilan Sampel Ikan	27
3.5.2 Prosedur Imunohistokimia dengan Confocal (CLSM)	28
a. Preparasi Histologi.....	28
b. Imunohistokimia.....	30
c. Pencitraan dengan Mikroskop Confocal (CLSM)	31
3.5.3 Pengukuran Kualitas Air	31
a. Suhu	31
b. Kecepatan Arus	32
c. Derajat Keasaman (pH)	32
d. Oksigen Terlarut (DO)	33
e. Total Bahan Organik (TOM)	33
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Kondisi Umum Lokasi Penelitian	35
4.1.1 Sungai Surabaya	35
4.1.2 Sungai Kalimas Surabaya	37
4.2 Analisis Tingkat Kematangan Gonad	38
4.3 Penganmatan Ekspresi Hormon 17- β Estradiol pada Gonad Ikan Tawes dengan CLSM	42
4.3.1 Gonad Ikan Tawes (<i>Puntius javanicus</i>) Sungai Surabaya.....	43
a. Ikan Tawes Betina	44
b. Ikan Tawes Jantan	45
4.3.2 Gonad Ikan Tawes (<i>Puntius javanicus</i>) Sungai Kalimas	47
a. Ikan Tawes Betina	47
b. Ikan Tawes Jantan	48
4.3.3 Gonad Ikan Tawes (<i>Puntius javanicus</i>) Kontrol	50
a. Ikan Tawes Betina	50
b. Ikan Tawes Jantan	51
4.4 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol	53
4.4.1 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol di Sungai Surabaya	54
a. Ikan Tawes Betina	54
b. Ikan Tawes Jantan	55
4.4.2 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol di Sungai Kalimas	56
a. Ikan Tawes Betina	56
b. Ikan Tawes Jantan	57
4.4.3 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol Ikan Kontrol	58
a. Ikan Tawes Betina	58
b. Ikan Tawes Jantan	59
4.5 Analisis Parameter Kualitas Air	72
4.5.1 Suhu	74
4.5.2 pH (<i>potential Hydrogen</i>)	75
4.5.3 Kecepatan Arus	75
4.5.4 Oksigen Terlarut (DO/ <i>Dissolved Oxygen</i>)	76
4.5.5 Total Bahan Organik	77

5. PENUTUP	78
5.1 Kesimpulan	78
5.2 Saran	78
DAFTAR PUSTAKA	79
LAMPIRAN	85



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tingkat kematangan gonad ikan <i>Kuhlia sandvicensis</i> menurut Tester dan Takata 1953 dalam Effendi, 1997.	8
2. Data suhu kualitas air dari peneliti terdahulu.....	21
3. Data pH kualitas air dari peneliti terdahulu.....	23
4. Data oksigen terlarut (DO) kualitas air dari peneliti terdahulu.....	24
5. Data total bahan organik (TOM) dari peneliti terdahulu.....	24
6. Diskripsi Sampel Ikan Tawes (<i>Puntius javanicus</i>).	38
7. Kuantifikasi preparat gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina	61
8. Kuantifikasi preparat gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan.	62
9. Tabulasi dari peneliti terdahulu.	70
10. Data analisa kualitas air.....	72
11. Data kualitas air dari peneliti terdahulu.	73

DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

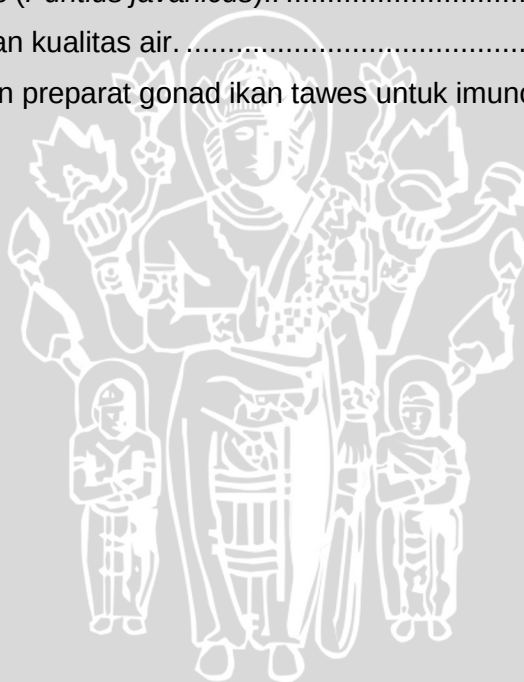
1. Ikan Tawes (<i>Puntius javanicus</i>).	7
2. Derivat Estrogen.	12
3. Olympus Fluoview 1000 Confocal Laser Scanning Microscope.	18
4. Prinsip Confocal.	20
5. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina di Sungai Surabaya dengan <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM).	45
6. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan di Sungai Surabaya dengan <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM).	46
7. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina di Sungai Kalimas Surabaya dengan <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM).	48
8. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan di Sungai Kalimas Surabaya dengan <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM).	49
9. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina kontrol dengan <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM).	51
10. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan kontrol dengan <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> (CLSM).	52
11. Hasil grafik 3-dimensi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina di Sungai Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A.	55
12. Hasil grafik 3-dimensi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan di Sungai Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A.	56

13. Hasil grafik 3-dimensi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina di Sungai Kalimas Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A.....	57
14. Hasil grafik 3-dimensi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan di Sungai Kalimas Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A.....	58
15. Hasil grafik 3-dimensi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina Kontrol dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A.....	59
16. Hasil grafik 3-dimensi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan control dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A.	60
17. Intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol dan standart deviasi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina.	65
18. Intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol dan standart deviasi dari gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan.	65
19. Mekanisme feedback pada hipotalamus-pituitari-jaringan testis. ...	69



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Peta lokasi sungai Surabaya dan Kalimas Surabaya.....	85
2. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.	86
3. Perhitungan Gonad Somatic Index (GSI).	88
4. Kuantifikasi Intensitas ekspresi hormone 17- β estradiol.	90
5. Analisa Uji BNT.....	99
6. PP No.82 Tahun 2001.....	102
7. Foto pengambilan sampel ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>).....	105
8. Foto ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>)..	106
9. Foto pengukuran kualitas air.	107
10. Foto pewarnaan preparat gonad ikan tawes untuk imunohistokimia..	108



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kondisi sungai di hilir mengalami pencemaran paling berat karena merupakan tempat penampungan buangan dari berbagai macam aktivitas manusia. Tingginya pencemaran yang terjadi di sungai Surabaya dan sungai Kalimas berasal dari banyaknya pabrik dan pemukiman penduduk yang berada di sekitar sungai (Suwari *et al.*, 2011). Sungai mempunyai berbagai fungsi yang sangat vital, yaitu sebagai penyedia bahan baku kebutuhan air minum, fungsi rekreasi, fungsi komunikasi dan konservasi ekosistem air sungai. Sungai Surabaya mempunyai fungsi pokok untuk menyediakan bahan baku air minum (PDAM) bagi masyarakat kota dan juga sebagai sumber kehidupan berbagai jenis biota sungai. Sungai Kalimas fungsi pokoknya adalah untuk drainase kota, kegiatan perikanan, peternakan, mengalir tanaman serta pariwisata air (Kominfo Jatim, 2013). Sementara itu kualitasnya cenderung mengalami penurunan Masduqi (2006), apalagi Surabaya adalah kota besar yang padat penduduk dan dan aktifitas-aktifitas manusia lainnya. Dari berbagai macam kegiatan tersebut pada akhirnya akan menghasilkan buangan-buangan yang mana pembuangan terakhirnya adalah di sungai. Jumlah penduduk di Sungai Brantas tahun 2005 adalah sebesar 43% dari jumlah penduduk Jawa Timur atau sekitar 15.884.000 jiwa dengan pertumbuhan rata – rata 0,99% dan kepadatan 1.272 jiwa/km² (Jasa Tirta, 2000; DPU, 2008). Kepadatan penduduk disepanjang sungai sedikit banyak akan berpengaruh terhadap kondisi lingkungan perairan sungai.

Pencemaran tersebut tidak lepas dari keberadaan pabrik dan pemukiman yang ada di daerah aliran DAS Brantas Jatim. Jumlah pabrik yang ada di DAS mencapai 1.004 unit, dengan rincian sebanyak 483 industri berada di

bantaran sungai, sebanyak 65 unit industri di Kalimas Surabaya dan 33 unit industri di Kalitengah (Kominfo Jatim, 2013). Kondisi ini akan berdampak negatif pada biota yang hidup di daerah hilir DAS Brantas, khususnya pada ikan. Ikan dapat digunakan sebagai bioindikator untuk mengetahui kandungan dan tingkat pencemaran suatu lingkungan perairan dikarenakan kandungan suatu bahan pencemar perairan dapat terakumulasi pada tubuh ikan. Sifat dari ikan yang dapat bergerak bebas atau *mobile* sehingga dapat menjadi indikator biologis kualitas suatu perairan.

Kontaminan lingkungan dari aktivitas estrogenik (berhubungan dengan hormon esterogen) baru-baru ini mendapat perhatian banyak pihak karena memiliki efek potensial pada reproduksi manusia dan satwa liar (Richardson *et al.*, 1999). Banyak dugaan bahwa sumber estrogen itu berasal dari polusi dan obat-obatan tertentu dalam saluran air (Winter, 2009). Beberapa studi menunjukkan bahwa produk rumah tangga yang umum seperti deterjen, plastik, pestisida, dan obat-obatan, serta senyawa alami dan limbah industri mengandung bahan kimia dengan aktivitas 'estrogenik' yang dapat mengkontaminasi lingkungan. Bahan kimia ini dapat masuk ke dalam tubuh, menjadi penyakit dan menimbulkan masalah pada reproduksi ikan jantan maupun betina terutama merusak hormon dan menyebabkan kelainan perkembangan pada sistem endokrin. Oleh karena itu bahan-bahan tersebut dikenal sebagai '*endocrine disruptors*' atau gangguan fungsi endokrin yang disebut sebagai *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDC) (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Man, 2002; Mazrouh dan Mahmoud, 2009; *Beyond Pesticides*, 2010). Salah satu organ yang mendapat pengaruh dari senyawa EDC adalah gonad. Gonad merupakan organ dwifungsi yang memproduksi sel benih dan hormon seks. Kedua fungsi ini berkaitan erat karena konsentrasi lokal hormon seks yang tinggi diperlukan untuk perkembangan sel benih. Ovarium

memproduksi ovum dan hormon steroid estrogen serta progesteron; testis memproduksi spermatozoa dan hormon testosteron (Granner, 2003).

1.2 Rumusan Masalah

Akibat lingkungan yang tercemar dengan berbagai macam bahan pencemar dan juga beberapa studi tentang pencemaran sungai Surabaya menurut hasil penelitian Suwari *et al.*, (2011), total beban pencemar bersumber limbah domestik yang diterima sungai Surabaya adalah BOD 33,16 ton/hari, COD 71,74 ton/hari dan TSS 161,65 ton/hari. Sedangkan untuk limbah pertanian BOD 101,08 kg/hari; COD 190,33 kg/hari; TSS 660,70 kg/hari dan untuk limbah industri BOD 22,22 ton/hari; COD 60,65 ton/hari; TSS 38,82 ton/hari. Hasil studi Purwaningsih (2005) yang dilakukan di sepanjang sungai Surabaya menunjukkan tingkat BOD dan DO tidak memenuhi baku mutu, kualitas struktur sungai 62,5% termasuk kategori sedang dan 37,5% termasuk kategori buruk. Hasil pantauan Perum Jasa Tirta I (2007) nilai COD 41,5 mg/l dan BOD 15,0 mg/l. Hasil riset *ECOTON* dan National Institute Minamata Disease menunjukkan badan air, lumpur, kerang, dan ekosistem sungai Surabaya telah terkontaminasi merkuri, timbal, cadmium, tembaga dan besi dengan kadar melebihi ambang batas (Arisandi, 2004). Perairan sungai Surabaya dapat dikatakan “tercemar” dengan pencemaran dari kadar limbah organik dan logam berat melebihi ambang batas baku mutu kualitas air yang ditetapkan menurut PP No.82, 2001. Studi kasus hasil penelitian Juanda (2013), menyatakan bahwa kondisi ikan Tawes (*Puntius javanicus*) yang ditemukan di sungai Kalimas Surabaya mengalami penyimpangan seksual (abnormal) yang diindikasikan dengan adanya ovotestis di dalam gonad jantan dimana penelitian tersebut menggunakan metode histopatologi. Analisis hispatologis dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada

organ-organ yang menjadi sasaran utama dari bahan pencemar seperti insang, hati, ginjal dan sebagainya (Marina dan Martinez, 2007). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang sejauh mana pengaruh hormon 17- β estradiol terhadap gonad ikan Tawes (*Puntius javanicus*) yang hidup di perairan Sungai Surabaya dan sungai Kalimas dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM). CLSM merupakan salah satu teknologi rancangan modern pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK). Berbagai macam desain mikroskop dirancang sesuai dengan kebutuhan untuk mengamati suatu sampel biologi, salah satunya adalah mikroskop *Confocal*.

1.3 Tujuan

1. Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) di sungai Surabaya dan sungai Kalimas dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).
2. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai intensitas rata-rata hormon 17- β estradiol gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) di sungai Surabaya dan sungai Kalimas.

1.4 Kegunaan

1.4.1 Kegunaan Praktis

Diharapkan penelitian ini dapat menambah pengetahuan, ketrampilan, serta memberikan informasi mengenai ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) yang terkait dengan pencemaran perairan di sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya.

1.4.2 Kegunaan Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi peneliti atau lembaga ilmiah, untuk melakukan penelitian, serta untuk mendukung kesempurnaan ilmu pengetahuan yang sedang berkembang saat ini mengenai ekspresi hormon 17β estradiol pada gonad ikan Tawes (*Puntius javanicus*) yang terkait dengan pencemaran perairan di sungai Surabaya dan sungai Kalimas.

Bagi masyarakat umum, sebagai informasi dan peringatan dini mengenai pengaruh pencemaran lingkungan terhadap sistem endokrin ikan.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret - April 2014 di Sungai Surabaya dan sungai Kalimas kota Surabaya. Kemudian dilanjutkan dengan serangkaian preparasi histologi di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dan pengamatan ekspresi hormon 17β Estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya, Malang.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan

2.1.1 Klasifikasi Ikan Tawes

Klasifikasi ikan tawes menurut Zipcodezoo (2013), adalah sebagai berikut:

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Osteichthyes
Subclass	: Actinopterygii
Order	: Cypriniformes
Family	: Cyprinidae
Subfamily	: Cyprininae
Genus	: Puntius
Specific name	: javanicus
Scientific name	: <i>Puntius javanicus</i>



Gambar 1. Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) (Googleimage, 2013)

2.1.2 Morfologi dan Habitat Ikan Tawes

Ikan tawes termasuk ke dalam famili Cyprinidae seperti ikan mas dan ikan nilem. Merupakan salah satu ikan asli Indonesia terutama pulau Jawa. Hal ini juga yang menyebabkan ikan tawes memiliki nama ilmiah *Puntius javanicus*

(Amri dan Khairuman, 2008). Ikan tawes dalam habitat aslinya merupakan ikan yang berkembang biak di sungai, danau dan rawa-rawa dengan lokasi yang disukai adalah di perairan yang airnya jernih dan terdapat aliran air. Sifat biologis dari ikan tawes yang membutuhkan banyak oksigen dan hidup di perairan tawar dengan suhu tropis 22-28°C serta pH optimalnya 7. Ikan ini ditemukan di dasar sungai mengalir pada kedalaman hingga lebih dari 15m, rawa dan waduk. Ikan tawes termasuk ikan herbivore atau pemakan tumbuhan. Bentuk badan agak panjang dan pipih dengan punggung meninggi, kepala kecil, moncong meruncing, mulut kecil terletak pada ujung hidung, sungut sangat kecil. Di bawah garis rusuk terdapat sisik 5½ buah dan 3-3½ buah diantara garis rusuk dan permulaan sirip perut. Garis rusuknya sempurna berjumlah antara 29-31 buah. Badan berwarna keperakan agak gelap di bagian punggung. Pada moncong terdapat tonjolan-tonjolan yang sangat kecil. Sirip punggung dan sirip ekor berwarna abu-abu atau kekuningan, sirip dada berwarna kuning dan sirip dubur berwarna oranye terang. Sirip dubur mempunyai 6½ jari-jari bercabang (Kottelat, *et al.*, 1993).

2.1.3 Tingkat Kematangan Gonad dan Indeks Kematangan Gonad

Gonad merupakan kelenjar endokrin yang dipengaruhi oleh hormon gonadotropin (GtH) yang disekresi oleh kelenjar pituitari. Gonadotropin tidak secara langsung mempengaruhi perkembangan telur dan sperma ikan, namun mempengaruhi sekresi estrogen oleh sel folikel telur dan androgen oleh jaringan testis. Estrogen yang umum terdapat dalam cairan ovarium teleostei adalah 17-β estradiol yang merupakan derivat dari 17α-hydroxyprogesterone, sedangkan androgen yang umum disintesis adalah testosterone (Fujaya, 2008).

Tingkat kematangan gonad adalah tahap-tahap perkembangan gonad sebelum dan sesudah memijah. Pencatatan terhadap perubahan atau tahap

perkembangan gonad diperlukan untuk mengetahui perbandingan ikan yang akan melakukan reproduksi dan yang tidak, juga untuk mengetahui kapan ikan akan memijah (Jabarsyah, 2011). Kriteria tingkat kematangan gonad ikan secara morfologis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tingkat kematangan gonad ikan *Kuhlia sandvicensis* menurut Tester dan Takata 1953 dalam Effendi, 1997.

Tingkat Kematangan Gonad	Jantan dan Betina
I	<i>Tidak Masak.</i> Gonad sangat kecil seperti benang dan transparan. Penampang gonad pada ikan jantan pipih dengan warna kelabu, penampang pada ikan betina bulat dengan warna kemerah-merahan.
II	<i>Permulaan Masak.</i> Gonad mengisi $\frac{1}{4}$ rongga tubuh. Warnanya pada ikan jantan kelabu atau putih, bentuknya pipih, sedangkan pada ikan betina warnanya kemerah-merahan atau kuning dan berbentuk bulat. Telur tidak tampak.
III	<i>Hampir masak.</i> Gonad mengisi $\frac{1}{2}$ rongga tubuh. Gonad pada ikan jantan berwarna putih, pada ikan betina berwarna kuning. Bentuk telur tampak melalui dinding ovarium.
IV	<i>Masak.</i> Gonad mengisi $\frac{3}{4}$ rongga tubuh. Gonad ikan jantan berwarna putih berisi cairan berwarna putih. Gonad betina berwarna kuning, hampir bening atau bening. Telur dapat terlihat. Kadang-kadang dengan tekanan halus pada perutnya ada yang menonjol pada lubang pelepasannya.
V	<i>Salin.</i> Hampir sama dengan tahap kedua dan sukar dibedakan. Gonad jantan berwarna putih, kadang-kadang dengan bintik coklat. Gonad betina berwarna merah, lembek dan telur tidak tampak.

Perkembangan gonad dapat diketahui dengan menghitung indeks kematangan gonad (IKG), yaitu perbandingan antara berat gonad dan berat tubuh ikan uji (Solang, 2009). Nilai indeks ini sering kali dihubungkan dengan

tingkat kematangan gonad yang diamati secara morfologi. *Gonado Somatic Index* (GSI) = $Wg/W \times 100\%$ akan semakin meningkat nilainya dan akan mencapai batas maksimum pada saat akan terjadi pemijahan. Pada ikan betina nilai GSI lebih besar dibandingkan dengan ikan jantan.

2.2 Sistem Endokrin Ikan

Penyusun sistem endokrin adalah kelenjar-kelenjar endokrin. Kelenjar endokrin mensekresikan senyawa kimia yang disebut dengan hormon. Hormon itu sendiri merupakan senyawa protein atau senyawa steroid yang mengatur kerja proses fisiologis tubuh. Hormon bekerjasama dengan sistem syaraf untuk mengatur pertumbuhan, reproduksi dan tingkah laku. Kedua sistem tersebut mengaktifkan sel untuk berinteraksi satu sama lain dengan menggunakan *messenger* kimia. Kelenjar endokrin menggunakan messenger kimia yaitu hormon yang diedarkan oleh darah sebagai sistem transportasi dan mempengaruhi sel target yang ada di seluruh tubuh. Fungsi sistem endokrin adalah untuk mengatur berbagai proses biologis, termasuk gula darah, pertumbuhan dan fungsi sistem reproduksi, metabolisme, perkembangan otak dan sistem saraf (Fujaya, 2008; Woo *et al.*, 2011).

2.2.1 Hormon

Hormon adalah zat kimia organik yang dibentuk dalam sel atau kelenjar yang sehat dan normal, disekresi langsung ke dalam darah dan dibawa ke sel/organ target, jumlahnya sangat kecil ($g=10^{-6}$ g, $ng=10^{-9}$ g) tetapi pengaruhnya sangat besar, berperan dalam integrasi dan koordinasi fungsi tubuh. Oleh karena itu hormon disebut juga sebagai pembawa pesan kimiawi di dalam tubuh. Pada ikan, hormon terdiri atas empat kelompok utama yaitu steroid, tiroksin, protein dan katekolamin, yang dihasilkan oleh kelenjar pituitari, tiroid, gonad, dan urophysis. Hormon-hormon ini bekerjasama dengan sistem saraf pusat sebagai

fungsi pengatur dalam berbagai kejadian dan metabolisme dalam tubuh. Jika hormon sudah berinteraksi dengan reseptor di dalam atau pada sel-sel target, maka komunikasi intraseluler dimulai (Anwar, 2005; Fujaya, 2008).

Pada hormon protein dan katekolamin, hormon adalah pembawa pesan I dan cAMP adalah pembawa pesan II, sedangkan pada steroid dan tiroksin, tidak ada pembawa pesan II, tetapi hormon tersebut bisa langsung ke inti untuk menyampaikan pesan yang dibawanya. Hormon tidak akan bekerja pada sel yang tidak memiliki reseptornya, tetapi bila hormon tersebut tiba pada sel/organ target maka reseptornya akan mengikat hormon tersebut. Reseptor pada permukaan sel biasanya mengenali jenis hormon protein dan katekolamin. Interaksi hormon dan reseptor pada permukaan sel merangsang peningkatan atau penurunan konsentrasi cAMP, Ca^{2+} , atau beberapa substansi yang lain. Sedangkan reseptor pada sitosol atau inti bertugas mengenali dan membawa hormon steroid dan toksin menuju ke inti. Interaksi reseptor spesifik pada sitosol atau inti, biasanya meningkatkan transkripsi gen-gen spesifik (Fujaya, 2008). Pada ikan teleostei, hormon yang berperan dalam seksual maturasi adalah $17\text{-}\beta$ estradiol (E_2) untuk betina, testosteron dan 11-KT untuk jantan.

Macam-macam hormon pemacu perkembangan gonad menurut Zairin (2003), hormon yang potensial digunakan untuk merangsang ovulasi dan pemijahan dapat dibagi menjadi 3 kelompok yaitu sebagai berikut :

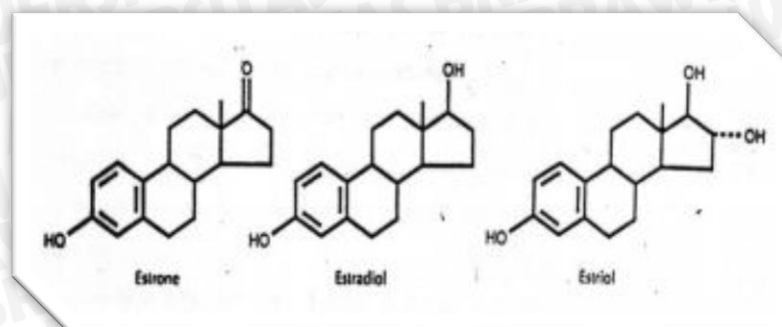
1. Gonadotropin
2. LHRH (*Luteinizing Hormone Releasing Hormone*)
3. Steroid

Perkembangan gonad pada ikan membutuhkan hormon gonadotropin yang dilepaskan oleh kelenjar pituitari yang kemudian terbawa aliran darah masuk ke gonad. Gonadotropin kemudian masuk ke sel teka, menstimulir terbentuknya testosteron yang kemudian akan masuk ke sel granulosa untuk

diubah oleh enzim aromatase menjadi estradiol 17- β . Hormon estradiol 17- β kemudian masuk ke dalam hati melalui aliran darah dan merangsang hati untuk mensintesis vitelogenin yang akan dialirkan lewat darah menuju gonad untuk diserap oleh oosit sehingga penyerapan vitelogenin ini disertai dengan perkembangan diameter telur. Aktivitas vitelogenin ini menyebabkan nilai GSI ikan meningkat (Potalangi *et al.*, 2004).

2.2.2 Hormon Estradiol

17- β estradiol adalah salah satu turunan hormon estrogen yang berperan penting dalam proses vitelogenesis. Estrogen merupakan salah satu hormon steroid kelamin, karena mempunyai struktur kimia berintikan steroid yang secara fisiologik sebagian besar diproduksi oleh kelenjar endokrin pada sistem reproduksi wanita. Hormon ini terutama disekresi oleh sel-sel glanulosa penyusun folikel ovarium melalui serangkaian konversi reaksi enzimatik. Substrat utama pembentuk estrogen adalah kolesterol. Kolesterol secara berurutan mengalami perubahan menjadi pregnenolon, progesterone, 17 α -hidroksi progesterone, androstenedion dan testoteron. Androstenedion kemudian diubah menjadi estron, sedangkan testosterone diubah menjadi estradiol 17- β , baik di sel teka maupun sel granulosa pada folikel ovarium. Struktur hormon estrogen tersusun atas 18 atom C, gugus -OH fenolik pada C-3, sifat aromatik cincin A dan tidak mempunyai gugus metal pada C-10 (Sitasiwi, 2005). Bentuk hormon estrogen dalam tubuh hewan betina berupa estron (E1), estradiol (E2), dan estriol (E3), namun yang paling sering dijumpai dengan jumlah yang cukup tinggi dan paling poten dalam tubuh adalah 17- β estradiol. Estradiol berperan dalam proses vitelogenesis pada ovarium (Zairin, 1997; Anwar, 2005).



Gambar 2. Derivat Estrogen (Anwar, 2005).

Estradiol merupakan hormon yang sangat penting yang dihasilkan oleh ovary terutama pada ikan betina yang sedang mengalami proses vitelogenesis. Estradiol mengalami peningkatan secara bertahap pada fase vitelogenesis sejalan dengan meningkatnya ukuran diameter oosit. Sintesis vitelogenin dirangsang oleh $17\text{-}\beta$ estradiol memasuki sistem peredaran darah kemudian merangsang hati mensintesis dan mensekresi vitelogenin. Adanya peningkatan konsentrasi estradiol dalam darah akan memacu hati melakukan proses vitelogenesis dan selanjutnya akan mempercepat proses pematangan gonad. Karena itu kadar steroid plasma dapat digunakan sebagai indikator dan pematangan gonad (Wang *et al.*, 2001; King dan Pankhurst, 2004). Dengan kata lain hormon $17\text{-}\beta$ estradiol bertanggungjawab dalam sintesis vitelogenin. Singh dan Singh (1990) juga menambahkan bahwa pada saat ovarium mencapai tingkat kematangan akhir maka sintesis $17\text{-}\beta$ estradiol akan menurun karena hal ini merupakan umpan balik negatif estrogen terhadap hormon yang menstimulasi sintesis. Hormon estradiol dibentuk oleh konversi ekstragonad testosterone. Kadar sintesis estrogen pada jaringan-jaringan ekstragonad meningkat sesuai usia dan berat tubuh. Seperti diketahui zat awal untuk sintesis hormon steroid terdapat di semua kelenjar hormon steroid, hormon mana yang pasti dan dimana akan dihasilkan tergantung dari :

1. Reseptor yang tersedia untuk pengaturan hormon (FSH, LH)

2. Enzim yang dominan untuk perubahan-perubahan susunan molekul steroid dalam setiap kelenjar hormon

FSH (*Folikel Stimulating Hormone*) berguna dalam menstimulasi pembentukan vitellogenesis atau spermatogenesis dan perkembangan awal gonad, sedangkan LH (*Luteining Hormon*) untuk menstimulasi maturasi akhir dari oosit dan ovulasi pada betina dan spermiasi pada jantan. Selain itu, gonadotropin juga menstimulasi steroidogenesis atau sintesis dari hormon steroid sex (androgens, estrogens dan progestins) yang bertindak dalam jaringan target dalam pengaturan gametogenesis. Pada kebanyakan ikan teleostei, E2 (estradiol) dan androgen T (testosteron) dan 11-ketotestosteron (11-KT) adalah steroid sex primer untuk pengaturan gametogenesis pada ikan jantan dan betina. Pada ikan jantan, FSH berperan secara keseluruhan pada proses spermatogenesis dan menurun pada saat spawning ketika LH menjadi meningkat. Gonadotropin ini menstimulasi proliferasi spermatogonia seperti pada sintesis androgen yang dibutuhkan untuk gametogenesis pada ikan jantan (Pait dan Nelson, 2002).

2.3 Mekanisme Pencemaran terhadap Perubahan Hormon Estradiol

Menurut Purwandari (2013) limbah yang mencemari sepanjang aliran sungai dapat diklarifikasi menjadi 3 yaitu : (1) limbah domestik yang pada umumnya dihasilkan oleh limbah industri rumah tangga, (2) sampah dari masyarakat baik yang dikelola atau yang dibuang sembarang tempat atau ditimbun juga dibakar, (3) limbah industri dan limbah pertanian yang berupa residu pupuk kimia atau pupuk cair juga limbah pestisida pembasmi hama penyakit tanaman. Beberapa pencemaran di sungai tentunya diakibatkan oleh kehidupan disekitarnya baik pada sungai itu sendiri maupun perilaku manusia sebagai pengguna. Pengaruh dominan terjadinya pencemaran yang sangat

terlihat adalah kerusakan yang diakibatkan oleh manusia dalam kuantitas tergantung dari pola kehidupannya. Setiap pinggiran sungai yang padat dengan pemukiman, dipastikan akan terlihat saluran-saluran buangan yang menuju ke badan sungai.

Kontaminan bahan pencemar masuk ke tubuh organisme melalui proses absorpsi. Absorpsi merupakan proses perpindahan racun dari tempat absorpsinya ke dalam sirkulasi darah. Absorpsi, distribusi dan ekskresi bahan pencemar tidak dapat terjadi tanpa transpor melintasi membran. Proses transportasi dapat berlangsung dengan 2 cara : transpor pasif (yaitu melalui proses difusi) dan transpor aktif (yaitu dengan sistem transport khusus, dalam hal ini zat lazimnya terikat pada molekul pengemban). Bahan pencemar dapat masuk ke dalam tubuh ikan melalui tiga cara yaitu melalui rantai makanan, insang dan difusi permukaan kulit (Hutagalung, 1984). Bahan pencemar yang masuk ke dalam lingkungan perairan akan mengalami tiga macam proses akumulasi yaitu fisik, kimia dan biologis. Buangan limbah industri yang mengandung bahan berbahaya dengan toksisitas yang tinggi ke lingkungan perairan mengakibatkan bahan pencemar langsung terakumulasi secara fisik dan kimia lalu mengendap di dasar laut. Melalui rantai makanan terjadi metabolisme bahan berbahaya secara biologis dan akhirnya akan mempengaruhi kesehatan manusia. Akumulasi melalui proses biologis inilah yang disebut dengan bioakumulasi (Sembiling, 2009). Keadaan lingkungan perairan yang tercemar dapat mempengaruhi kehidupan biotadi dalamnya khususnya ikan. Zat zat tersebut dapat berpengaruh pada fungsi fisiologis endokrin ikan, salah satunya pada gonad ikan dan akan berpengaruh pada hormon. Dimana proses yang terjadi selanjutnya adalah terganggunya perkembangan reproduksi dan pertumbuhan ikan (Ken dan Ridlo, 2005).

Oleh karena adanya peranan 17- β estradiol pada biosintesis vitelogenin maka faktor lingkungan juga sangat berpengaruh. Beberapa kegiatan penduduk yang menghasilkan limbah antropogenik dan limbah industri mengandung bahan kimia dengan aktivitas 'estrogenik' yang dapat mengkontaminasi lingkungan. Bahan kimia ini dapat masuk ke dalam tubuh, menjadi penyakit, dan mengganggu reproduksi jantan maupun betina terutama merusak hormon dan menyebabkan kelainan perkembangan pada sistem endokrin. Oleh karena itu bahan-bahan tersebut dikenal sebagai '*endocrine disruptors*' atau *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDC) (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Man, 2002; *Beyond Pesticides*, 2010).

2.4 Gangguan Sistem Endokrin

Lingkungan yang tercemar senyawa-senyawa kimia sebagai salah satu bahan pencemar sebagai akibat dampak antropogenik pada lingkungan dan merupakan penyebab *Endocrine Disrupting Chemical* (EDC). *Endocrine disruptors* diartikan sebagai agen atau substansi luar yang dapat mengganggu sistem kestabilan kelenjar endokrin dalam tubuh dan mengacu sistem atau fungsi hormon dalam tubuh manusia dan hewan (Pait dan Nelson, 2002). Secara garis besar gangguan endokrin didefinisikan sebagai gangguan perkembangan gonad, baik adanya perubahan pada perkembangan ovotestis yang mengarah pada feminisasi (Liney, *et al.*, 2005) atau adanya rangsangan munculnya karakter kelamin sekunder jantan yang mengarah pada maskulinisasi (Larsson, *et al.*, 2006). Gangguan ini dapat terjadi akibat adanya substansi kimia di perairan yang mengganggu sistem endokrin pada organisme ikan. Umumnya, substansi kimia, baik bersifat alami ataupun sintesis yang dikenal sebagai *endocrine disruptors*, memiliki kemampuan untuk berikatan dengan estrogen reseptor atau androgen reseptor (Larsson, *et al.*, 2006) tergantung pada mekanismenya. Substansi

kimiawi yang berpotensi memberikan gangguan endokrin bisa berasal dari bahan alami ataupun sintesis. Substansi yang merupakan bahan alami, antara lain: hormon (17β estradiol, estriol, estrone, progesterone, testosterone), sedangkan bahan sintesis, antara lain: herbisida, insektisida dan bahan kimia yang digunakan pada berbagai industri (Falconer, *et al.*, 2006).

Beberapa hasil akhir dari pengolahan limbah yang masuk kedalam sungai dapat men-estrogenik-kan ikan karena bahan keluaran tersebut mengandung bahan kimia atau kombinasi dari beberapa bahan kimia yang kemudian akan di absorpsi oleh ikan. Hal tersebut menyebabkan terjadinya gangguan pada perkembangan reproduksi termasuk reproduksi pada perkembangan gonad, hambatan proses spermatogenesis, reproduksi hormon seks steroid, reduksi konsentrasi hormon pituitari dan menghambat kesuburan yang dapat menyebabkan *maskulinasi* ikan betina. Sedangkan pada ikan jantan memproduksi vitelogenin secara berlebihan sehingga mengakibatkan gangguan perkembangan dan diferensiasi pada gonad serta perkembangan abnormal karakteristik seks sekunder pada ikan jantan yang disebut *feminisasi*. Perkembangan abnormal seks sekunder tersebut disebut dengan *intersex*. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa *intersex* yang terjadi pada ikan diakibatkan gangguan sistem endokrin yang menaikkan konsentrasi estrogen dalam ikan (Kime *et al.*, 1999; Sumter dan Jobling, 2002; Zuvancz *et al.*, 2008).

2.5 Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

Seiring dengan kemajuan jaman, Pengembangan Ilmu Pengetahuan & Teknologi (IPTEK) sebagai usaha dalam pembangunan nasional ditujukan untuk meningkatkan kesejahteraan masyarakat secara berkelanjutan. Teknologi yang berhubungan dengan bidang biologi molekuler adalah mikroskop. Berbagai

macam desain mikroskop dirancang sesuai dengan kebutuhannya untuk mengamati suatu sampel biologi. Salah satu rancangan modern yang sering digunakan saat ini adalah *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) atau mikroskop *confocal*.

Olympus Fluoview FV 1000 *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) merupakan alat yang digunakan untuk melihat sampel yang telah diwarnai dengan metode fluoresensi, sehingga memungkinkan identifikasi suatu sampel dengan cepat. Kunci utama menggunakan Olympus Fluoview FV 1000 ini adalah dengan penggunaan teknik filtrasi spasial (*Spacial Filtering Technique*) serta preparasi sampel tidak membutuhkan waktu yang lama. Olympus Fluoview FV 1000 *Confocal Laser Scanning Microscope* ini mudah mendapatkan gambar dengan kualitas yang sangat tinggi dan resolusi yang besar (sampai 4096 x 4096 pixel). Hasil dari microscope ini akan masuk ke dalam komputer yang secara khusus dapat beroperasi dengan CLSM seperti yang terlihat pada Gambar 2 (Pawley, 2006; Pandango, 2010).



Gambar 3. Olympus Fluoview FV 1000 *Confocal Laser Scanning Microscope*

Menurut Tortora (2001), pengamatan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) untuk mengamati sampel berdasarkan adanya pendaran warna atau *fluorescence*. Mikroskop ini menggunakan penerangan

berupa sinar laser yang dapat dihubungkan dengan komputer sehingga mampu menghasilkan gambar 3 dimensi. Olympus Fluoview FV 1000 *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) dirancang untuk beroperasi pada *windows standart* sistem komputer.

2.5.1 Spesifikasi *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM)

A. Prinsip

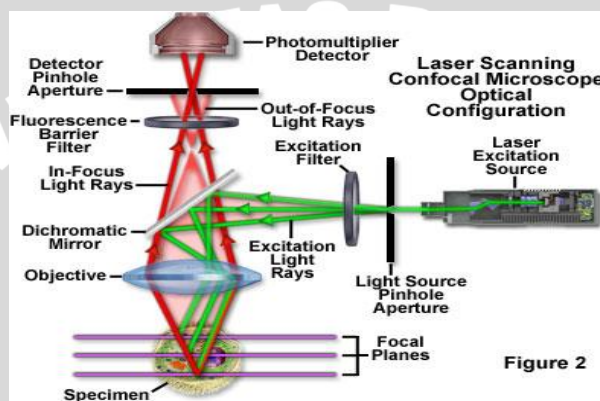
Prinsip kerja dari alat ini pada dasarnya menggunakan sumber cahaya sinar laser untuk memindai spesimen yang telah diwarnai kemudian dipantulkan menuju satu celah *confocal* sehingga hasil pencitraan lebih fokus. Cahaya tersebut diserap oleh partikel-partikel tertentu dalam spesimen dan dipancarkan kembali membentuk suatu penampakan terang yang umum disebut dengan fluoresensi. Mikroskop ini dapat dihubungkan dengan komputer sehingga mampu menghasilkan gambar 3 dimensi (Pawley, 2006).

B. Instrumentasi

Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) ini dilengkapi dengan berbagai system laser, yaitu:

- *Laser multi Argon*. *Laser multi argon* adalah salah satu dari laser ion yang menggunakan gas mulia sebagai medium yang aktif dan laser multi argon ini juga dapat memancar pada beberapa panjang gelombang melalui spectrum cahaya tampak (485nm – 488nm – 515nm).
- *Laser HeNe G*. *Laser Hane G* adalah laser gas yang bekerja secara kontinu dan beroperasi pada daerah hijau dengan spectrum 559nm.
- *Laser HeNe R*. *Laser HeNe R* adalah laser gas yang beroperasi pada daerah merah dengan spectrum 635nm.

Laser sendiri adalah singkatan dari *Light Amplification by Stimulation Emission Radiation* yang artinya perbesaran intensitas cahaya melalui pancaran radiasi yang terangsang, berkas cahaya dihasilkan oleh adanya rangsangan (stimulasi) dari luar berupa energi foton yang diinteraksikan terhadap bahan aktif laser. Berkas laser memiliki sifat-sifat yang khas, yaitu tingkat kemonokromatisan yang tinggi, koherensi ruang dan waktu tinggi, dan memiliki tingkat keterarahan sinar yang tinggi (S Claxton, 2007).



Gambar 3. Prinsip Confocal

2.5.2 Fluorescence

Fluoresence adalah peristiwa pemancaran cahaya oleh suatu benda dengan panjang gelombang yang lain pada saat benda tersebut mendapatkan radiasi atau energi (Pandango, 2010). Sedangkan *Fluorophore* merupakan salah satu zat *fluorescent* yang digunakan dalam pewarnaan biologis untuk menghasilkan *fluoresensi* dalam spesimen. *Fluorophore* biasanya digunakan sebagai pewarna untuk mewarnai struktur tertentu, sebagai substrat enzim, atau sebagai *probe* untuk menghasilkan *fluoresensi*. *Fluorophore* menyerap energi cahaya dari panjang gelombang tertentu dan memancarkan cahaya dengan panjang gelombang lebih panjang (Marson, 1999).

2.5.3 Keunggulan dan Kelemahan Mikroskop Confocal

Keunggulan dari *confocal microscopy* adalah kemampuannya untuk mendapatkan gambar yang fokus dari kedalaman yang dipilih, proses tersebut dikenal sebagai *optic sectioning*. Gambar diperoleh secara bertahap (*point by point*) dalam dimensi x, y, dan z sebagai fungsi waktu dan ditampilkan dalam banyak warna (menggunakan dua atau lebih *fluorophore*). Keuntungan lain dari mikroskop *confocal* pemindaian termasuk kemampuannya untuk mengatur perbesaran secara elektronik dengan bervariasi area yang dipindai oleh laser tanpa harus mengubah objektif. Sedangkan kelemahannya adalah bahaya intensitas radiasi laser yang tinggi untuk jaringan dan sel hidup (Olympus Corp., 2009).

2.6 Pengukuran Kualitas Air

Menurut Nybakken (1992), sifat fisik dan kimia perairan sangat penting dalam ekologi. Oleh karena itu selain melakukan pengamatan terhadap faktor biotik, perlu juga dilakukan pengamatan terhadap faktor abiotik. Dengan mempelajari aspek saling ketergantungan antara organisme dengan faktor abiotik maka akan diperoleh gambaran tentang kualitas suatu perairan. Faktor abiotik yang diukur merupakan faktor pendukung komposisi ikan di sungai, meliputi: parameter fisika dan parameter kimia. Parameter fisiknya adalah suhu dan kecepatan arus. Sedangkan parameter kimianya adalah pH (*Puissance Hydrogen*), oksigen terlarut (DO) dan total bahan organik (TOM).

2.6.1 Parameter Fisika

a. Suhu

Suhu dari suatu badan air dipengaruhi oleh musim, lintang (*latitute*), ketinggian dari permukaan laut, waktu dalam hari, sirkulasi udara, penutupan awan, dan aliran serta kedalaman badan air (Effendi, 2003). Suhu

mempengaruhi aktivitas metabolisme organisme, karena itu penyebaran organisme baik di lautan maupun di perairan air tawar dibatasi oleh suhu perairan tersebut. Secara umum laju pertumbuhan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu, dapat menekan kehidupan hewan budidaya bahkan menyebabkan kematian bila peningkatan suhu sampai *ekstrim* (drastis) (Kordi, 2007).

Perubahan suhu akan mempengaruhi proses kimia dan biologi. Perubahan suhu yang besar akan berakibat terhadap kelangsungan hidup biota perairan seperti ikan dan lainnya. Baku mutu air yang peruntukannya digunakan untuk pembudidayaan ikan, peternakan dan pertanian tidak boleh melebihi kisaran 28-32°C dari kondisi alamnya (PP No.82 tahun 2001). Berbagai penelitian mengenai kualitas perairan di sungai Surabaya dan sungai Kalimas dari parameter fisika terutama suhu, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data suhu kualitas air dari peneliti terdahulu.

Parameter	Sungai	Nilai	Referensi	Baku Mutu Kualitas Air menurut PP No.82, 2001 (mg/l).
Suhu (°C)	Sungai Surabaya	28°C	Juanda (2013)	28 – 32 °C
		32,3°C	Santoso (2013)	
		29°C	Jasa Tirta (2014)	
	Sungai Kalimas	29°C	Juanda (2013)	
		31,1°C	Santoso (2013)	
		28,5°C	Jasa Tirta (2014)	

b. Kecepatan Arus

Arus air adalah faktor yang mempunyai peranan yang sangat penting baik pada perairan letik maupun pada perairan lentik. Hal ini berhubungan dengan penyebaran organisme, gas-gas terlarut dan mineral yang terdapat di dalam air. Kecepatan aliran air akan bervariasi secara vertikal. Arus air pada perairan lotik umumnya bersifat tusbulen yaitu arus air yang bergerak ke segala arah sehingga air akan terdistribusi ke seluruh bagian dari perairan. Pada ekosistem lentik arus

dipengaruhi oleh kekuatan angin, semakin kuat tiupan angin akan menyebabkan arus semakin kuat dan semakin dalam mempengaruhi lapisan air. Pada perairan letik umumnya kecepatan arus berkisar antara 3 m / detik. Meskipun demikian sangat sulit untuk membuat suatu batasan mengenai kecepatan arus. Karena arus di suatu ekosistem air sangat berfluktuasi dari waktu ke waktu tergantung dari fluktuasi debit dan aliran air dan kondisi substrat yang ada (Barus, 2001).

Kecepatan arus sungai dipengaruhi oleh kemiringan, kesuburan kadar sungai. Kedalaman dan keleburan sungai, sehingga kecepatan arus di sepanjang aliran sungai dapat berbeda-beda yang selanjutnya akan mempengaruhi jenis substrat sungai (Ozum, 1993).

2.6.2 Parameter Kimia

a. pH

Derajat keasaman adalah ukuran untuk menentukan sifat asam dan basa. Perubahan pH di suatu air sangat berpengaruh terhadap proses fisika, kimia, maupun biologi dari organisme yang hidup di dalamnya. Derajat keasaman diduga sangat berpengaruh terhadap daya racun bahan pencemaran dan kelarutan beberapa gas, serta menentukan bentuk zat didalam air (Azwir, 2006). pH menyatakan nilai konsentrasi ion hidrogen dalam suatu larutan, didefinisikan sebagai logaritma dari resiprokal aktivitas ion hidrogen dan secara matematis dinyatakan sebagai $pH = \log 1/H'$, dimana H' adalah banyaknya ion hidrogen dalam mol per liter (Barus, 2001). Sebagian besar biota akuatik sensitive terhadap perubahan pH dan nilai pH yang optimal sekitar 6 - 8,5. Nilai pH sangat mempengaruhi proses biokimiawi perairan, misalnya proses nitrifikasi akan berakhir pada pH yang rendah (PP No.82, 2001; Suryanto, 2011). Berikut adalah nilai pH dari peneliti terdahulu pada sungai Surabaya dan sungai Kalimas digambarkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Data pH kualitas air dari peneliti terdahulu.

Parameter	Sungai	Nilai	Referensi	Baku Mutu Kualitas Air menurut PP No.82, 2001 (mg/l).
pH	Sungai Surabaya	7	Juanda (2013)	6 – 8,5
		7	Santoso (2013)	
		6,76	Jasa Tirta (2014)	
	Sungai Kalimas	7	Juanda (2013)	
		7	Santoso (2013)	
		7,39	Jasa Tirta (2014)	

b. Oksigen Terlarut (DO)

Mays (1996) menyatakan bahwa oksigen terlarut (dissolved oksigen) yang sering disebut dengan DO adalah parameter hidrobiologis yang dianggap sangat penting karena keberadaannya menentukan hidup matinya organism. DO merupakan salah satu parameter mengenai kualitas air. Tersedianya oksigen terlarut di dalam air sangat menentukan kehidupan di perairan tersebut (Prahutama, 2013). Menurut PP No.82 tahun 2001, baku mutu kandungan DO di sungai adalah 6 Mg/l. Sementara hasil DO dari peneliti terdahulu pada sungai Surabaya dan Kalimas rata-rata masih dibawah angka 6 seperti pada Tabel 4.

Penyebab utama berkurangnya kadar oksigen terlarut dalam air disebabkan karena adanya zat pencemar yang dapat mengurangi oksigen. Zat pencemar tersebut terutama terdiri dari bahan-bahan organik dan non organik yang berasal dari berbagai sumber, seperti kotoran (manusia dan hewan), sampah organik, bahan-bahan buangan industri dan rumah tangga. Sebagian besar zat pencemar yang menyebabkan oksigen terlarut berkurang adalah limbah organik (Purwandari, 2013).

Tabel 4. Data oksigen terlarut (DO) kualitas air dari peneliti terdahulu.

Parameter	Sungai	Nilai	Referensi	Baku Mutu Kualitas Air menurut PP No.28, 2001 (mg/l).
DO	Sungai Surabaya	2,7-6,6	Suwari <i>et al.</i> , (2010)	≥ 6
		3,10-3,80	Jasa Tirta (2009)	
		5,31	Juanda (2013)	
		3,34	Prahotama (2013)	
		5	Santoso (2013)	
	Sungai Kalimas	3,1	Jasa Tirta (2014)	
		1,27-3,04	Putri <i>et al.</i> , (2011)	
		3,9	Juanda (2013)	
		3,5	Santoso (2013)	

c. Total Bahan Organik (TOM)

Dekomposisi bahan organik pada dasarnya terjadi melalui dua tahap. Pada tahap pertama, bahan organik diuraikan menjadi bahan anorganik. Pada tahap kedua, bahan organik yang tidak stabil mengalami oksidasi menjadi nitrit dan nitrat atau biasa disebut dengan nitrifikasi. Kalium permanganate (KMnO_4) telah lama dipakai sebagai oksidator pada penentuan konsumsi oksigen untuk mengoksidasi bahan organik, yang dikenal sebagai parameter nilai permanganate atau sering disebut sebagai kandungan bahan organik total atau TOM (*Total Organic Matter*). Akan tetapi, kemampuan oksidasi oleh permanganate sangat bervariasi, tergantung pada senyawa-senyawa yang terkandung dalam air (Effendi, 2003).

Berbagai penelitian mengenai kualitas perairan di sungai Surabaya dan sungai Kalimas dari parameter kimia TOM, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data total bahan organik (TOM) kualitas air dari peneliti terdahulu.

Parameter	Sungai	Nilai	Referensi	Baku Mutu Kualitas Air menurut SNI
TOM	Sungai Surabaya	8,25	Santoso (2013)	≤50 (mg/l)
	Sungai Kalimas	8,88	Santoso (2013)	

3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan tawes (*Puntius javanicus*) yang diambil dari perairan sungai Surabaya (lokasi 1) dan Kalimas Surabaya (lokasi 2) dapat dilihat pada (Lampiran 1) serta ikan kontrol diambil dari Balai UPT Pengembangan Budidaya Air Tawar (PBAT) Umbulan, Pasuruan. Parameter pendukung kualitas air yang diukur meliputi: suhu, kecepatan arus, pH perairan, oksigen terlarut (DO) dan total bahan organik (TOM). Kemudian dilanjutkan dengan serangkaian penelitian laboratorium yaitu preparasi histologi gonad yang dilakukan di Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dan pengamatan ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) di laboratorium LSIH Universitas Brawijaya, Malang. Ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) dari sungai Surabaya dan Kalimas Surabaya dilihat dengan teknik imunohistokimia menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Menurut Suryabrata (2010), metode deskriptif adalah suatu metode yang menggambarkan keadaan atau kejadian-kejadian pada suatu daerah tertentu. Dalam metode ini pengambilan data dilakukan tidak hanya terbatas pada pengumpulan dan pengambilan data, tapi meliputi analisis dan pembahasan tentang data tersebut. Metode ini bertujuan untuk memberikan

gambaran secara umum, sistematis, aktual dan valid mengenai fakta dan sifat-sifat populasi daerah tersebut. Dalam penelitian ini, juga didukung dengan data primer dan data sekunder, untuk data primer meliputi observasi lapang.

3.3.1 Data Primer

Menurut Mulyanto (2008), data primer adalah data yang didapat dari sumber pertama. Data primer dapat berupa opini subyek (orang) secara individual atau kelompok, hasil observasi terhadap suatu benda atau kegiatan, dan hasil pengujian. Data primer tersebut dapat diperoleh dengan cara-cara observasi, wawancara, dan partisipasi langsung.

a. Observasi

Observasi adalah kegiatan pengumpulan data melalui pengamatan atas gejala, fenomena, dan fakta empiris yang terkait dengan masalah penelitian (Musfiqon, 2012). Dalam penelitian ini, observasi tersebut dilakukan terhadap pengamatan langsung kondisi perairan atau DAS Brantas Surabaya.

b. Wawancara

Wawancara adalah suatu proses memperoleh keterangan untuk tujuan penelitian dengan cara tanya jawab sambil bertatap muka dengan responden, dengan menggunakan panduan wawancara (Musfiqon, 2012). Wawancara dilakukan terhadap pencari ikan. Materi wawancara meliputi kondisi daerah sekitar, jenis ikan, jumlah ikan yang tertangkap, jenis alat tangkap yang digunakan, dan permasalahan yang dihadapi.

c. Partisipasi Aktif

Partisipasi aktif adalah keterlibatan dalam suatu kegiatan yang dilakukan secara langsung di lapang. Partisipasi aktif pada penelitian ini dilakukan dengan cara mengikuti kegiatan pengambilan sampel ikan di

sungai dan pengamatan di laboratorium. Pengambilan sampel ikan di sungai adalah dengan memancing menggunakan jala pancing bersama pemancing warga sekitar sungai Surabaya.

3.3.2 Data Sekunder

Sedangkan menurut Azwar (1997), data sekunder dapat berupa data dokumen atau data laporan yang telah tersedia. Dalam penelitian ini, data sekunder diperoleh melalui jurnal, laporan skripsi; thesis dan dari pihak lembaga pemerintah.

3.4 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di lapang maupun di laboratorium, yaitu:

1. Pengambilan sampel ikan tawes (*Puntius javanicus*) dilakukan di Sungai Surabaya dan Kalimas Surabaya.
2. Pengambilan sampel ikan tawes (*Puntius javanicus*) kontrol di Balai UPT Pengembangan Budidaya Air Tawar (PBAT) Umbulan, Pasuruan.
3. Preparasi histologi gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) dilakukan di Laboratorium Patologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.
4. Pewarnaan imunohistokimia dan pengamatan ekspresi hormon 17β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya, Malang.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Sampel Ikan

Pengambilan ikan tawes (*Puntius javanicus*) di sungai Surabaya dan Kalimas Surabaya dilakukan dengan menggunakan jala pancing. Pengambilan

ikan dibantu oleh pemancing setempat. Sedangkan pengambilan ikan tawes (*Puntius javanicus*) kontrol dari balai Umbulan, Pasuruan dilakukan dengan menggunakan jaring-jaring. Kemudian ikan dari sungai maupun dari balai yang tertangkap secara acak dipilih jantan dan betina kurang lebih dengan ukuran panjang total yang sama. Ikan ditimbang terlebih dahulu untuk mendapatkan nilai IKG (Indeks Kematangan Gonad). Setelah itu dibedah perut ikan dengan menggunakan *sectio set* dan diambil bagian gonad. Gonad juga ditimbang dengan timbangan untuk mendapatkan nilai IKG (Indeks Kematangan Gonad). Lalu dimasukkan ke dalam botol film yang berisi larutan formalin 10% dengan tujuan pengawetan, kemudian dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Brawijaya untuk preparasi histologi. Apabila preparat telah jadi dilakukan pewarnaan Imunohistokimia dan diamati ekspresi hormon 17- β estradiol dengan Confocal di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Brawijaya.

3.5.2 Prosedur *Immunofluorescence* dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM)

a) Preparasi Histologi

Metode preparasi histologi sebelum pengamatan ekspresi hormon 17- β Estradiol dengan menggunakan CLSM diambil dari Shobikhuliatul (2013) dan telah dimodifikasi. Analisis preparasi histologi ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Prosedur tersebut berturut-turut sebagai berikut:

1. Fiksasi

Sampel gonad dimasukkan ke dalam larutan formalin 10%.

Kemudian didiamkan 24 jam. Setelah itu dipotong membujur dan dimasukkan ke dalam tissu tex.

2. Dehidrasi

Sampel gonad dimasukkan berturut-turut ke dalam larutan alkohol 70% I, alkohol 70% II, alkohol 90% I, alkohol 90% II, alkohol absolut I dan II masing-masing selama 45 menit.

3. Clearing

Sampel gonad dimasukkan ke dalam larutan xylol murni I, II, dan III masing-masing selama 45 menit.

4. Infiltrasi

Sampel gonad dimasukkan ke dalam larutan xylol : parafin (1:1) cair selama 20 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam larutan parafin cair I, II, dan III masing-masing selama 20 menit di dalam oven dengan suhu 60°C.

5. Embedding (penanaman sampel) dan Blocking (pembuatan blok)

Sampel gonad dimasukkan ke dalam larutan parafin I, parafin II masing-masing selama 45 menit. Kemudian diambil dan diletakkan di atas cetakan *stainlesssteel* yang sudah dipanaskan di atas *hot plate*. Setelah sampel ditata di atas cetakan, parafin cair dituangkan di atas cetakan sampai membenamkan seluruh potongan sampel.

6. Sectioning (pengirisan) dan peletakan pada gelas objek

Blok dipasang di dalam *microtom* yang sudah disetel dengan ketebalan 5-6 mikron. Pemotongan dilakukan secara pelan dan konstan, bila irisan sudah mencapai sampel. Kemudian dipindahkan irisan ke dalam baskom yang berisi air dingin dan ditempelkan pada *object glass* yang telah diberi kode. Lalu dicelupkan ke dalam *water bath* agar sampel mengembang. Setelah itu dikeringkan di atas *hot plate* dengan suhu 28°C.

7. Affixing

Direkatkan dengan menggunakan albumin dan gliserin dengan perbandingan 1:1 dan disimpan dalam kotak sediaan selama 1 hari.

b) Imunohistokimia

Setelah preparat siap maka diberi perlakuan lebih lanjut di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya. Metode yang digunakan juga merupakan modifikasi dari beberapa jurnal penelitian yang dijadikan sebagai acuan. Perlakuan ini meliputi penghilangan parafin dan pewarnaan dengan imunofluoresen. Adapun urutan kerjanya sebagai berikut:

1. Deparafinisasi

Preparat dimasukkan berturut-turut ke dalam larutan xylol 1, xylol 2, etanol absolute 1, etanol absolute 2, etanol 90%, etanol 70% masing-masing selama 5 menit untuk menghilangkan parafin.

2. *Staining* (pewarnaan antibodi)

Preparat histologi yang sudah hilang parafinnya diproses untuk pewarnaan imunofluoresensi dengan dicuci 3x dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Kemudian direndam dalam bufer sitrat (pH 6) pada suhu tinggi selama 10 menit. Lalu dicuci 3x dalam PBS. Setelah itu preparat diblok dengan BSA 2% dalam PBS (pH 7,4) selama 60 menit. Dicuci kembali 3x dalam PBS. Lalu diinkubasi dalam anti 17- β Estradiol Mouse (Santacruz) dengan konsentrasi (1:2000) sebagai antibodi primer selama 60 menit pada suhu 4°C. Preparat dicuci 3x dalam PBS dan diinkubasi dalam antibodi sekunder anti-mouse igG-Rhodamine red x dengan konsentrasi (1:1500) dalam BSA (*Bovine Serum Albumin*) 2% selama 60 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap. Setelah itu preparat dicuci kembali dengan PBS dan dikeringkan (Jelks *et al.*, 2007; Giddabasappa *et al.*, 2010; Barouk *et al.*, 2011).

c) Pencitraan dengan Mikroskop Confocal

Preparat kemudian diamati dengan menggunakan perbesaran 200x. Untuk mengeksitasi antibodi sekunder Rhodamine, gambar *fluorescent* dikumpulkan dengan argon/krypton *mixed gas laser* (543 nm). Gambar diambil dalam bentuk *Fluoresensi* Rhodamine berupa pendaran berwarna merah, 3D hitam putih (DIC), dan *Super Impose* (SI) yang menampilkan gabungan kedua gambar *fluoresensi* dan DIC. Ekspresi Estradiol ditentukan dengan estimasi kuantitatif berdasarkan intensitas pewarnaan relatif pada area *fluoresensi* (Calaf dan Roy, 2007).

3.5.3 Pengukuran Kualitas Air

a. Suhu

Prosedur pengukuran suhu pada perairan di lokasi penelitian dengan menggunakan alat DO meter adalah sebagai berikut:

1. Mengkalibrasi terlebih dahulu kemudian ditekan tombol power dan dibiarkan $\pm 3 - 5$ menit sampai dalam keadaan stabil.
2. Menekan tombol bertanda panah ke atas dan ke bawah secara bersamaan kemudian dilepaskan.
3. Menekan mode sampai terbaca % oksigen.
4. Menaikkan atau diturunkan nilai altitude dengan menggunakan tombol tanda panah ke atas dan ke bawah sampai sesuai dengan nilai altitude dan tekan enter.
5. DO meter siap digunakan, memasukan probe ke perairan.
6. Menyalakan DO meter, ditunggu sampai angka stabil dimana angka atas menunjukkan nilai DO (oksigen terlarut) dalam mg/l dan angka dibawah menunjukkan nilai suhu dalam oC
7. Kemudian mencatat hasilnya

b. Kecepatan Arus

Prosedur pengukuran kecepatan arus di lokasi penelitian dengan menggunakan alat berupa botol bekas air mineral yang diikat tali raffia adalah sebagai berikut:

1. Mengisi botol bekas dengan air secukupnya sebagai pemberat dan dihanyutkan di bagian sungai tempat penelitian dalam jarak tertentu dan diukur waktu tempuhnya.
2. Menghitung data jarak dan waktu kecepatan arus sungai.

$$\text{Perhitungan } v = \frac{s}{t}$$

3. Mencatat hasilnya.

c. Derajat keasaman (pH)

Prosedur analisis derajat keasaman (pH) pada perairan di lokasi penelitian dengan menggunakan pH meter adalah sebagai berikut :

1. Pertama-tama membuka penutup pH meter di bagian bawah.
2. Kemudian membasuh elektrod dengan cara mencelupkan pH meter tersebut pada air bersih dan di lap dengan kain bersih.
3. Menekan tombol "ON" untuk menghidupkan pH meter.
4. Memasukkan elektrod ke dalam perairan yang hendak diukur pH nya.
5. Memasukkan perlahan-lahan sehingga bacaan pH menjadi stabil.
6. Menekan tombol "HOLD" jika ingin menyimpan data yang terbaca dan jika ingin mengukur sekali lagi, ditekan tombol "HOLD" sekali lagi.
7. Setelah menggunakannya, membersihkan ujung elektrod dengan air bersih dan menutup kembali pH meter setelah digunakan.

d. Oksigen terlarut (DO)

Alat yang digunakan adalah DO meter. Prosedur pengukuran oksigen terlarut sebagai berikut :

1. Mengkalibrasi terlebih dahulu kemudian ditekan tombol power dan dibiarkan $\pm 3 - 5$ menit sampai dalam keadaan stabil.
2. Menekan tombol bertanda panah ke atas dan ke bawah secara bersamaan kemudian dilepaskan.
3. Menekan mode sampai terbaca % oksigen.
4. Menaikkan atau diturunkan nilai altitude dengan menggunakan tombol tanda panah ke atas dan ke bawah sampai sesuai dengan nilai altitude dan tekan enter.
5. DO meter siap digunakan, memasukan probe ke perairan.
6. Menyalakan DO meter, ditunggu sampai angka stabil dimana angka atas menunjukkan nilai DO (oksigen terlarut) dalam mg/l dan angka dibawah menunjukkan nilai suhu dalam $^{\circ}\text{C}$
7. Kemudian mencatat hasilnya.

e. Total Organik Matter (TOM)

Prosedur pengukuran TOM (Total Organik Matter) menurut Hariadi (1992), adalah sebagai berikut:

1. Memasukkan 250 ml air sampel ke dalam Erlemeyer
2. Menambahkan 4,5 ml KMnO_4 dari buret
3. Menambahkan 5 ml H_2SO_4
4. Memanaskan sampai 70°C kemudian diangkat
5. Menurunkan suhu sampai menjadi 65°C
6. Menambahkan Na-oxalate 0,01 N perlahan sampai tidak berwarna

7. Mentitrasi dengan KMnO_4 sampai berwarna (merah jambu atau pink)
dan dicatat ml titran (x ml)

8. Mencatat ml titran yang digunakan (y ml)

Perhitungan $\text{TOM} = \frac{(x-y) \times 31,6 \times 0,01 \times 1000}{\text{ml air sampel}}$

9. Mencatat hasilnya



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kondisi Umum Lokasi Penelitian

4.1.1 Sungai Surabaya

Sungai Surabaya merupakan anak sungai hilir DAS Brantas yang mengalir di Surabaya dan memiliki luas daerah aliran sebesar 630,7 km². Dengan panjang sekitar 41 km, Sungai Surabaya melewati empat wilayah kabupaten, yaitu Mojokerto, Gresik, Sidoarjo hingga Surabaya. Sungai Surabaya mempunyai beberapa anak sungai utama, yaitu Sungai Kedungsumur, Sungai Marmoyo, Sungai Banjaran, Sungai Tengah dan Sungai Kedurus (Suwari *et al.*, 2011). Lebar Sungai Surabaya bervariasi antara 60 hingga 100 meter dengan debit air sungai antara 20 hingga 100 m³/detik (Masduki dan Apriliani, 2008).

Sungai Surabaya merupakan salah satu sumber daya alam dengan potensi air tawar cukup besar, yaitu sebagai: sumber baku air minum, industri, pertanian dan sarana rekreasi, namun banyak diketahui bahwa sungai Surabaya pada saat ini telah beralih fungsi ke sejumlah fungsi lain, diantaranya sebagai pemukiman padat penduduk sampai ratusan industri berskala kecil dan besar. Jumlah pabrik yang ada di DAS mencapai 1.004 unit, dengan rincian sebanyak 483 industri berada di bantaran sungai, sebanyak 65 unit industri di Kalimas Surabaya dan 33 unit industri di Kalitengah (Kominfo Jatim, 2013). Ecoton (*Ecological Observatio and Wetlands Observation*) telah menemukan bahwa di sepanjang sungai Surabaya terdapat sekitar 600 pabrik dan hanya 60 pabrik yang memenuhi syarat pengolahan limbah. Menurut Bapedal Jatim (2006), kualitas air sungai Surabaya mengalami penurunan semanjak dimulainya industrialisasi pada awal tahun 1980-an. Pada tahun 1987, Surabaya telah mengalami pencemaran air sungai yang sangat berat, dimana air sungai merupakan pemasok air baku untuk PDAM berubah menjadi hitam, keruh dan

berbau. Hal tersebut merupakan akibat dari pencemaran limbah industri yang berjajar di sepanjang sungai. Menurut Masduqi dan Apriliani (2008), pencemaran berat yang terjadi di sungai Surabaya disebabkan oleh limbah industri dan limbah domestik di daerah padat penduduk.

Sungai Surabaya sebagai suatu sistem menerima beban pencemaran organik dan anorganik dari berbagai sumber pencemar baik *point sources* maupun *non point sources* yang menyebabkan penurunan kualitas air. Dampak negatif pencemaran air akan mengganggu kehidupan ekologis biota air, penurunan nilai ekonomi air sebagai sumber baku air minum, dan risiko kesehatan masyarakat. Menurut hasil penelitian Suwari *et al.* (2011), total beban pencemar bersumber dari limbah domestik, limbah industri, dan limbah pertanian. Total bahan pencemar sungai Surabaya untuk BOD 55,49 ton/hari, COD 132,58 ton/hari, dan TSS 210,13 ton/hari. Untuk parameter BOD kontribusi limbah domestik 59,77%, limbah industri 40,05%, dan limbah pertanian 0,18%. Sumber bahan pencemar COD 54,11% berasal dari limbah domestik, 45,74% (industri) dan 0,15% (pertanian), sedangkan beban TSS 80,37% bersumber dari limbah domestik 19,30% oleh limbah industri dan 0,33 akibat limbah pertanian. Utomo *et al.* (2008) juga melaporkan bahwa telah terjadi pencemaran air dan sedimen senyawa Cr di sungai Surabaya tepatnya di Cangkir yaitu 0,41 mg/l pada sampel air dan 1,23 mg/l pada sedimen. Sedangkan untuk senyawa Pb di sepanjang aliran sungai Surabaya sebesar 9,028-12,543 mg/l (Febrianto *et al.*, 2011) dan senyawa Cd sebesar 0,003 (Suwari *et al.*, 2011).

Berdasarkan studi literatur data sekunder tentang kualitas air sungai Surabaya dapat dikatakan tercemar karena rata-rata tiap parameter kualitas air menunjukkan melebihi ambang batas baku mutu kualitas air yang ditetapkan menurut PP No.82, 2001.

4.1.2 Sungai Kalimas

Sungai Kalimas merupakan sungai yang berasal dari percabangan dan bagian hilir DAS Brantas yang bermuara di selat Madura. Mengalir ke arah pantai utara Pulau Jawa melewati tengah kota Surabaya yang terdiri dari kecamatan Wonokromo, Tegalsari, Gubeng, Genteng, Bubutan, Pabean Cantikan, Krembangan dan Semampir. Kalimas Surabaya memiliki panjang kurang lebih 11,375 km (Wonokromo sampai muara), lebar antara 20-25 m dengan kedalaman berkisar antara 1,5-3,5 m yang mengalir meliuk dan sebagian melurus, khususnya di bagian utara. Arus Kalimas Surabaya relatif kecil dengan substrat umumnya berlumpur (BLH, 2008). Di sepanjang aliran sungai Kalimas terdapat pemukiman warga, industri pabrik dan berbagai macam kegiatan manusia dengan kontribusi sampah dan limbah domestik yang dibuang ke sungai Kalimas sehingga mengakibatkan pencemaran. Beberapa sumber buangan tersebut adalah kegiatan rumah tangga, pasar, saluran drainase, limbah pabrik dan kegiatan non rumah tangga di sekitar sungai Kalimas. Sumber sumber buangan tersebut menyebabkan pendangkalan sungai atau endapan lumpur yang semakin bertambah.

Beberapa studi telah banyak dilakukan di sungai Kalimas, salah satunya adalah penelitian Putri *et al.*, (2011), telah didapatkan hasil pengukuran dari beberapa parameter kualitas air di sungai Kalimas dengan DO sebesar 1,27-3,04 mg/l; BOD 9-37 mg/l; COD 16-60 mg/l dan TSS sebesar 142-182 mg/l. Santoso (2013), telah melaporkan bahwa di Kalimas terdapat jenis organoklorin DDT di ikan Tawes sebesar 0,0176 mg/Kg, Heptaklor di ikan Tawes dan Nila sebesar 0,0028 mg/Kg dan 0,0024 mg/Kg. Juanda (2013), juga menyatakan bahwa akibat pencemaran di sungai Kalimas menyebabkan keabnormalan pada gonad ikan tawes yaitu diindikasikan dengan adanya ovotestis di dalam gonad jantan dengan kadar hormon estrogen di air sungai mencapai 100 pg/ml.

4.2 Analisis Tingkat Kematangan Gonad

Pengamatan perkembangan gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) pada penelitian yang dilakukan di Sungai Surabaya, sungai Kalimas dan di Balai (sebagai kontrol) dilakukan secara morfologi. Metode yang dilakukan melalui pembedahan perut ikan dan mengamati ciri-ciri kematangan gonad secara morfologisnya. Tingkat kematangan gonad menurut Tester dan Takata (1953) dalam Effendie (1997), dibagi menjadi 5 golongan. Ikan tawes dari Sungai Surabaya berada pada TKG golongan II, III dan IV pada ikan betina, dan pada ikan jantan pada TKG golongan II dan III. Ikan tawes di Kalimas Surabaya berada pada TKG golongan II, III dan IV sedangkan pada jantan berada pada TKG golongan II dan III. Pada ikan kontrol gonad pada TKG golongan II dan III. Berikut adalah hasil diskripsi ikan tawes disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Diskripsi Sampel Ikan Tawes (*Puntius javanicus*)

Lokasi	Jenis Kelamin	Ikan	Panjang Ikan (cm)	Berat Ikan (g)	Berat Gonad (g)	TKG	GSI
Sungai Surabaya	Betina	I	22,5	170	1,64	II	0,96
		II	18,5	230	8,42	III	3,66
		III	19,5	210	25,81	IV	12,2
	Jantan	I	18	120	1,48	III	1,2
		II	19,5	125	1,23	II	0,98
		III	20	170	3,21	III	1,88
Sungai Kalimas	Betina	I	20	190	1,20	II	0,63
		II	22	220	3,52	III	1,6
		III	21,5	270	32,57	IV	12
	Jantan	I	18	110	0,69	II	0,62
		II	17,5	90	0,88	II	0,97
		III	21,5	200	3,24	III	1,62
Kontrol (Balai)	Betina	I	24	250	2,88	II	1,15
		II	24,5	280	3,41	II	1,21
		III	24,5	300	34,98	III	11,6
	Jantan	I	29	380	13,69	II	3,6
		II	26	300	5,09	II	1,6
		III	26	380	14,58	III	3,8

Berdasarkan Tabel diatas dapat dilihat diskripsi keseluruhan sampel ikan tawes mulai dari lokasi yang di sungai Surabaya, sungai Kalimas dan di Balai sebagai ikan kontrol. Pada ikan tawes betina dan jantan juga diukur

panjang tubuh (cm), berat ikan (g), berat gonad (g), serta TKG (Tingkat Kematangan Gonad) dan GSI (*Gonado Somatic Index*). Untuk keterangan ciri-ciri kematangan gonad yang diamati berdasarkan morfologi ikan dapat dilihat pada Tabel 1. Kisaran indeks kematangan gonad (GSI) ikan tawes betina pada sungai Surabaya berkisar antara 0,96-12,2 dan ikan tawes jantan berkisar antara 0,98-1,88. Indeks kematangan gonad (GSI) ikan tawes betina pada sungai Kalimas Surabaya berkisar antara 0,63-12 dan ikan tawes jantan berkisar antara 0,62-1,62. Sedangkan Indeks kematangan gonad (GSI) ikan tawes betina Kontrol berkisar antara 1,15-11,6 dan untuk ikan tawes jantan berkisar antara 1,6-3,8. Perhitungan indeks kematangan gonad dapat dilihat pada lampiran 3. Berdasarkan penelitian tersebut diperoleh kesimpulan bahwa dengan naiknya tingkat kematangan gonad (TKG) terjadi kenaikan nilai indeks kematangan gonad.

Effendie (1997) menambahkan bahwa, *Gonado Somatic Index* (GSI) = $Wg/W \times 100\%$ akan semakin meningkat nilainya dan akan mencapai batas maksimum pada saat akan terjadi pemijahan. Adakalanya nilai GSI ini dihubungkan dengan Tingkat Kematangan Gonad (TKG) yang pengamatannya berdasarkan ciri-ciri morfologi kematangan gonad. Dengan memperbandingkan demikian akan tampak hubungan antara perkembangan di dalam dan di luar gonad, atau nilai-nilai morfologi yang dikuantitatifkan. Bergantung pada macam dan pola pemijahannya, maka akan didapatkan nilai indeks yang sangat bervariasi pada setiap saat.

Hasil dari penelitian Sabet *et al.*, (2009) menyatakan bahwa hubungan antara kematangan seksual dan tingkat hormone steroid utama dalam gonad yaitu 17- β estradiol dan testosterone ikan Kutum (*Rutilus frisii*) betina yang diteliti dengan menggunakan histologi dan radioimmunoassay selama musim

pemijahan dari Laut Kaspian terjadi perubahan dalam plasma steroid gonad 17- β estradiol dan testosterone yang berkorelasi erat dengan perkembangan ovarium dan peningkatan indeks kematangan gonad (GSI). GSI meningkat pada bulan Maret dan mencapai nilai tertinggi pada bulan April dan menurun tajam pada awal Mei. Puncak tertinggi tingkat plasma 17- β estradiol dan testosterone adalah selama musim pemijahan dan berkaitan dengan GSI. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat 17- β estradiol dan testosterone ikan Kutum betina pada kematangan seksual tahap IV secara signifikan lebih tinggi daripada gonad yang belum matang (ovarium pada tahap II dan III). Plasma 17- β estradiol dan testosterone meningkat pada bulan Februari kemudian puncaknya pada bulan Maret sampai awal April dan menurun di awal bulan Mei selama musim pemijahan.

Chonish (1998), juga telah meneliti profil hormone steroid plasma dan gonad dari ikan Nila di bendungan Syferkuil Dam dan menyatakan bahwa perubahan musim mempengaruhi hubungan perubahan kondisi gonad dengan kadar plasma steroid gonad. Kadar plasma testosterone Nila jantan bila dihubungkan dengan GSI memuncak selama bulan September dan turun ke tingkat yang lebih rendah dari Oktober hingga Februari. Kadar plasma 17- β estradiol ikan Nila betina meningkat dari bulan Mei hingga Juli dan mencapai puncaknya pada bulan Agustus dan menurun hingga tidak terdeteksi pada bulan November dan Desember. Tingkat plasma progesterone ikan Nila betina rendah dari Januari hingga Agustus, setelah itu meningkat secara signifikan hingga Desember. Hasil menunjukan interaksi yang erat antara isyarat lingkungan dan reproduksi endokrin kontrol. Endokrin kontrol tidak dapat melanjutkan tanpa isyarat lingkungan yang sesuai. Hal ini dapat digunakan sebagai titik awal untuk berkembangbiak dalam kondisi laboratorium yang terkendali ketika mencoba

untuk memanipulasi pemuliaan buatan dengan intervensi hormonal. Selanjutnya hasil dari penelitian Widodo *et al.*, 2013, yang meneliti tentang tingkat kematangan gonad dan indeks kematangan gonad ikan gabus (*Chana gachua*) pada bulan Januari sampai Desember didapatkan hasil bahwa tingkat kematangan gonad ikan gabus (*Chana gachua*) mengalami variasi setiap bulan dapat meningkat atau menurun. Diduga curah hujan mempengaruhi GSI. Ketika curah hujan meningkat pada bulan April sampai Mei, nilai GSI meningkat, sementara selama bulan Mei hingga Juni ketika curah hujan meningkat GSI tetap tinggi. Pada bulan Juli ketika curah hujan menurun, nilai GSI juga menurun.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa perubahan lingkungan terutama musim dapat mempengaruhi tingkat kematangan gonad dan indeks kematangan gonad. Selain itu pemicu ovulasi dan pemijahan adalah kondisi lingkungan seperti penyinaran, suhu, curah hujan dan ketersediaan pangan (Robert *et al.*, 1999). Nazari (2010) juga menambahkan bahwa peran hormon steroid seks dalam mengendalikan siklus pematangan ikan teleostei terutama pada saat pemijahan dapat berubah oleh lingkungan atau manipulasi hormonal.

Hubungan antara panjang dengan berat tubuh ikan bersifat relaiif, dapat berubah dengan perubahan waktu. Jika factor-faktor disekitar organisme seperti kondisi lingkungan perairan dan ketersediaan makanan berubah maka kemungkinan nilai b yang diperoleh juga akan berubah. Nilai b adalah koefisien pertumbuhan yang menggambarkan kecenderungan pertambahan panjang (L) dan berat (W). Variasi dalam nilai b berhubungan dengan perbedaan kondisi ekologi habitat ikan atau variasi dalam fisiologi masing-masing ikan (Le Cren, 1951), seks dan musim (Hossain *et al.*, 2006), makanan, perkembangan gonad dan fase pertumbuhan (Taken *et al.*, 2006), tingkah laku ikan (perenang aktif atau pasif), dan arus (Muchlisin *et al.*, 2010). Pertumbuhan sendiri dipengaruhi

banyak faktor yang dapat digolongkan ke dalam dua faktor besa, yaitu factor dalam dan faktor luar. Faktor dalam merupakan faktor yang sukar dikontrol, diantaranya adalah genetic, sex, umur, parasit dan penyakit (Effendi, 1997). Sedangkan faktor luar adalah ketersediaan makanan dan lingkungan (zat hara dan suhu). Di daerah tropis, zat hara memang berperan lebih penting dibandingkan suhu lingkungan, yang meliputi makanan, air dan oksigen.

4.3 Pengamatan Ekspresi Hormon 17- β Estradiol pada Gonad Ikan Tawes dengan menggunakan Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

Imunohistokimia merupakan suatu proses mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel dengan menggunakan antibodi. Tempat pengikatan antara antibodi dengan protein spesifik diidentifikasi dengan marker yang biasanya dilekatkan pada antibodi dan bisa divisualisasi secara langsung atau dengan reaksi untuk mengidentifikasi marker. Marker dapat berupa senyawa berwarna, zat berfluoresensi, logam berat, label radioaktif, atau enzim. Pengamatan ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) ini menggunakan dua macam antibodi yaitu, antibodi primer dan antibodi sekunder (berlabel). Antibodi primer bertugas mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (*first layer*), sedangkan antibodi sekunder akan berkaitan dengan antibodi primer (*second layer*). Antibodi kedua merupakan anti-antibodi primer. Pelabelan antibodi sekunder diikuti dengan penambahan substrat berupa kromogen. Kromogen merupakan suatu gugus fungsi senyawa kimiawi yang dapat membentuk senyawa berwarna bila bereaksi dengan senyawa tertentu. Pelabelan merupakan pemberian bahan-bahan untuk dapat mewarnai preparat, sedangkan antibodi adalah suatu immunoglobulin yang dihasilkan oleh system imun dalam merespon kehadiran suatu antigen tertentu. Antibodi dibentuk berdasarkan antigen yang menginduksinya. Antigen itu sendiri

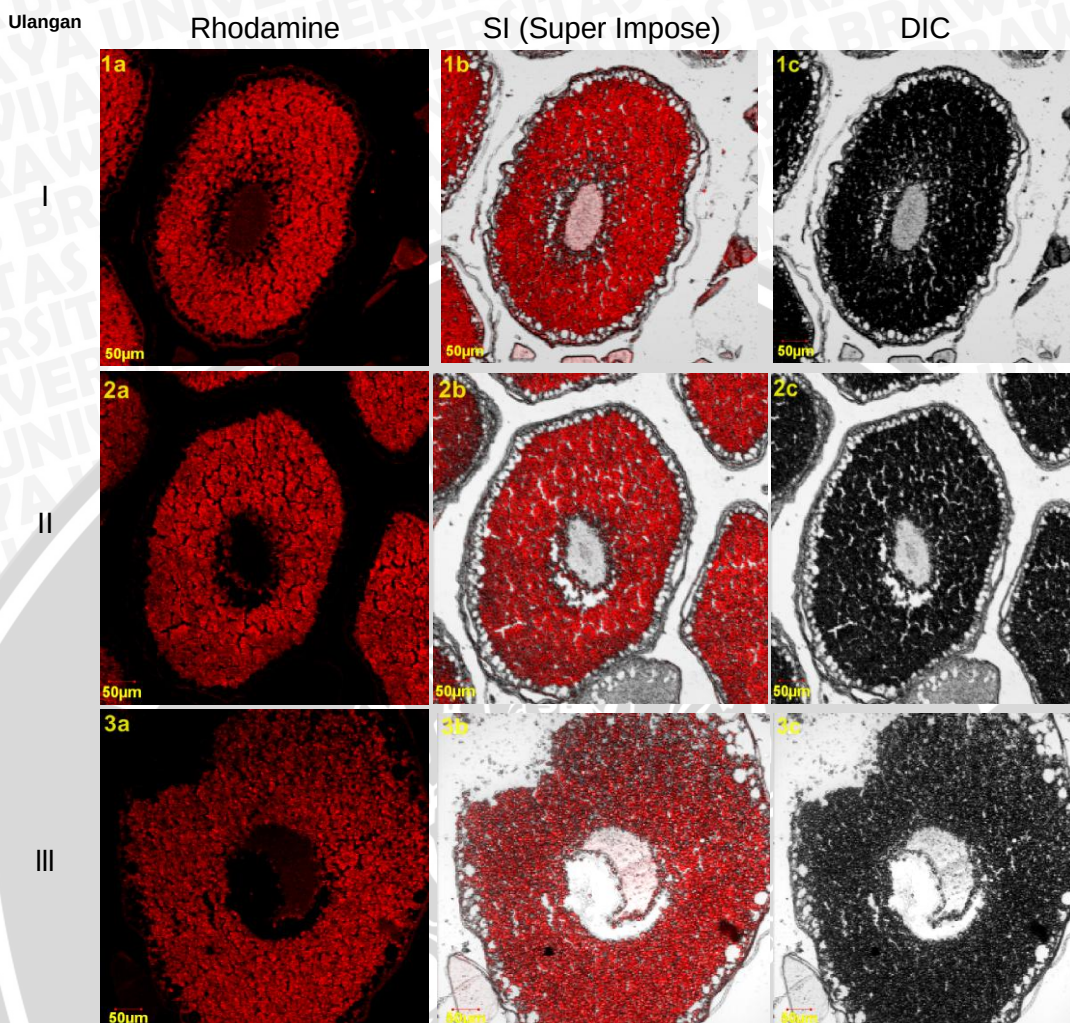
adalah suatu zat atau substansi yang dapat merangsang sistem imun dan dapat bereaksi secara spesifik dengan antibodi membentuk kompleks terkonjugasi. Ikatan antibodi-antigen divisualisasikan menggunakan senyawa label/marker (Imunohistokimia, 2012).

Antibodi primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah Anti 17- β Estradiol Mouse (Santacruz[®]) dan Antibodi sekundernya adalah Anti Mouse IgG-Rhodamine red X (KPL[®]) yang dapat menunjukkan pendaran warna merah pada gambar yang terekspresi. Dalam penelitian ini terdapat tiga lokasi sampel ikan tawes (*Puntius javanicus*) yaitu Sungai Surabaya, Sungai Kalimas dan Kontrol dari Balai. Masing-masing lokasi diambil sampel tiga ikan jantan dan tiga ikan betina. Setiap preparat yang diamati terdapat 3 gambar yang ditampilkan yaitu, gambar dengan rhodamine, Super Impose dan DIC. Preparat target yang diamati kemudian diambil 3 titik pada gambar fluoresensi rhodamine untuk mendapatkan grafik tiga dimensi dan estimasi kuantitatif intensitas fluoresensi yang selanjutnya dirubah menjadi data excel untuk melihat intensitas rata-rata sampel gonad ikan tawes. Hasil pengamatan dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) terhadap gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) dari masing-masing lokasi dapat dilihat pada gambar berikut.

4.3.1 Gonad Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) Sungai Surabaya

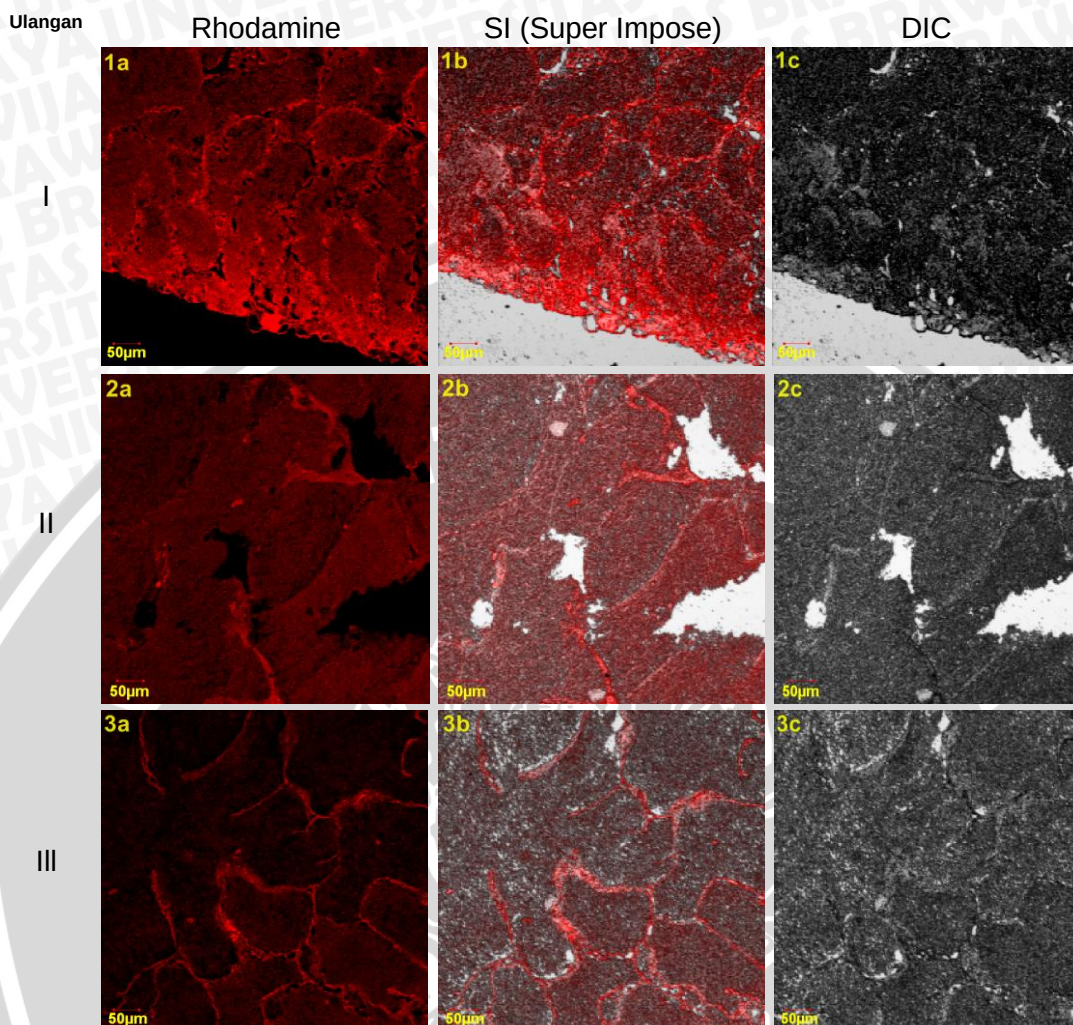
Pada saat pengamatan diambil tiga gambar, yaitu dengan rhodamin, *Differential Interference Contrasts* (DIC) menampilkan gambar yang lebih detail berupa 3-dimensi hitam putih, selanjutnya *Super Impose* (SI) yang dapat menampilkan bentuk gabungan dari Fluorosensi Rhodamine dan 3-dimensi dari (DIC) sehingga tampak lokalisasi hormon 17- β estradiol yang tersebar pada specimen gonad ikan tawes.

a. Ikan Tawes Betina.



Gambar 5. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina di Sungai Surabaya dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) *Super Impose*; (1c) (2c) dan (3c) *Diferential Interference Contrasts* (DIC). Perbesaran 200x dengan skala 50 μ m.

b. Ikan Tawes Jantan



Gambar 6. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan di Sungai Surabaya dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) *Super Impose*; (1c) (2c) dan (3c) *Differential Interference Contrast* (DIC). Perbesaran 200x dengan skala 50 μ m

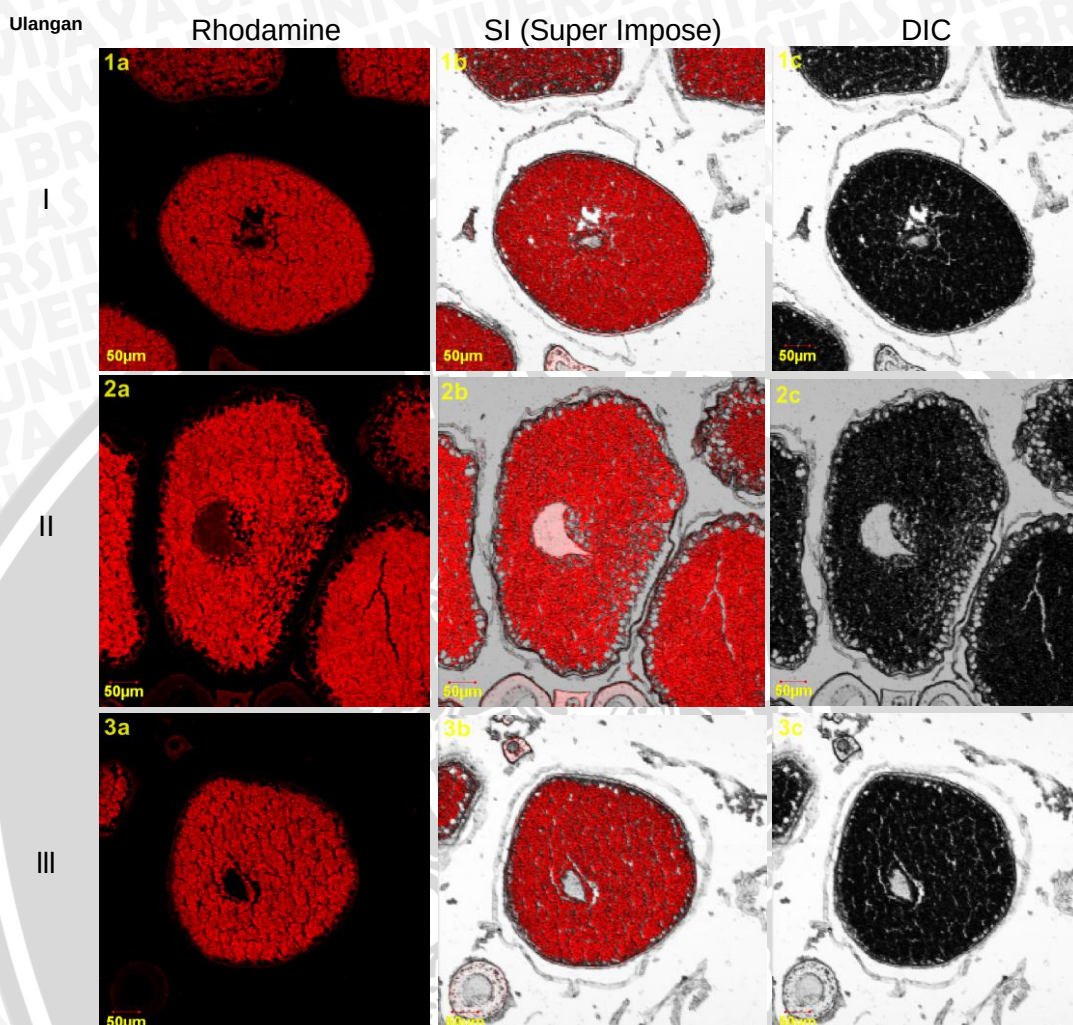
Berdasarkan Gambar 5 tampak adanya pendaran warna merah pada specimen gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina sungai Surabaya yang telah diberi antibodi primer dan sekunder (berlabel). Antibodi primer yang digunakan adalah Anti 17- β Estradiol Mouse (Santacruz[®]), sedangkan antibodi sekundernya adalah Anti Mouse IgG-Rhodamine red X (KPL[®]). Pendaran warna merah menunjukan bahwa protein estradiolnya terekspresi. Bagian yang gelap

atau tidak menunjukkan pendaran warna berarti pada bagian tersebut tidak ada hormon 17- β estradiol yang terekspresi. Pendaran warna merah ditunjukkan oleh gambar fluoresensi dengan Rhodamine (1a), (2a) dan (3a). Selanjutnya pada gambar (1b), (2b) dan (3b) menunjukkan Super Impose (SI) menampilkan bentuk gabungan dari *Fluoresensi* Rhodamine dan 3D dari DIC sehingga tampak lokalisasi hormon 17- β Estradiol yang tersebar pada spesimen gonad ikan tawes betina. Pada (1c), (2c) dan (3c) terdapat gambar yang lebih detail berupa 3-dimensi hitam dan putih DIC (*Differential Interference Contrasts*). Hampir semua bagian gonad ikan betina terekspresi, ditunjukkan dengan banyaknya pendaran warna merah yang muncul.

Pada Gambar 6 gonad ikan tawes jantan sungai Surabaya juga tampak adanya pendaran warna merah hampir di semua bagian ada. Pendaran ini ditunjukkan oleh gambar *fluoresensi* dengan Rhodamine (1a), (2a) dan (3a). Selanjutnya pada gambar (1b), (2b) dan (3b) menunjukkan *Super Impose* (SI) menampilkan bentuk gabungan dari *Fluoresensi* Rhodamine dan 3D dari DIC sehingga tampak lokalisasi hormon 17- β Estradiol yang tersebar pada spesimen gonad ikan tawes jantan. Pada (1c), (2c) dan (3c) terdapat gambar yang lebih detail berupa 3-dimensi hitam dan putih DIC (*Differential Interference Contrasts*).

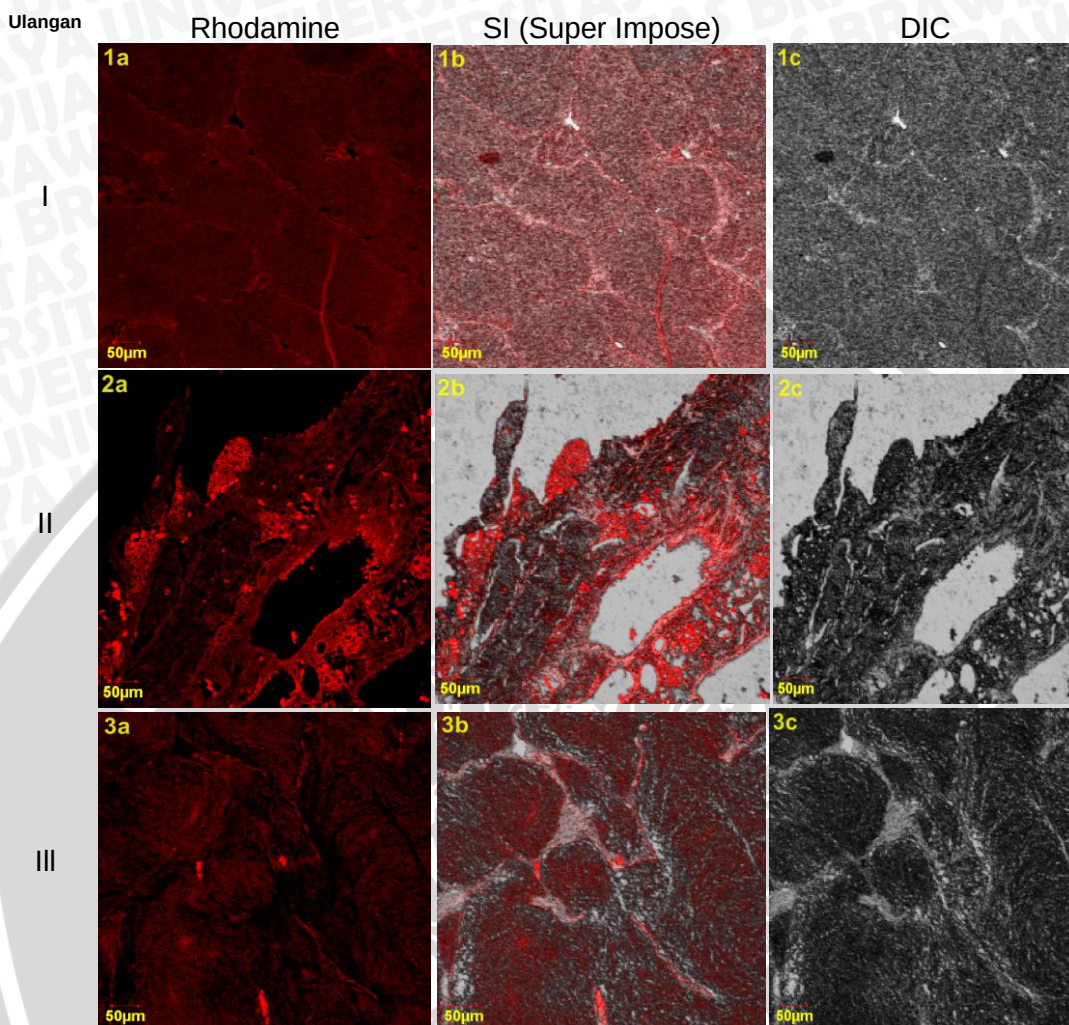
4.3.2 Gonad Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) Sungai Kalimas

a. Ikan Tawes Betina



Gambar 7. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina di Sungai Kalimas Surabaya dengan Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) Super Impose; (1c) (2c) dan (3c) Diferential Interference Contrasts (DIC). Perbesaran 200x dengan skala 50 μ m.

b. Ikan Tawes Jantan



Gambar 8. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan di Sungai Kalimas Surabaya dengan Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) Super Impose; (1c) (2c) dan (3c) Diferential Interference Contrasts (DIC). Perbesaran 200x dengan skala 50 μ m.

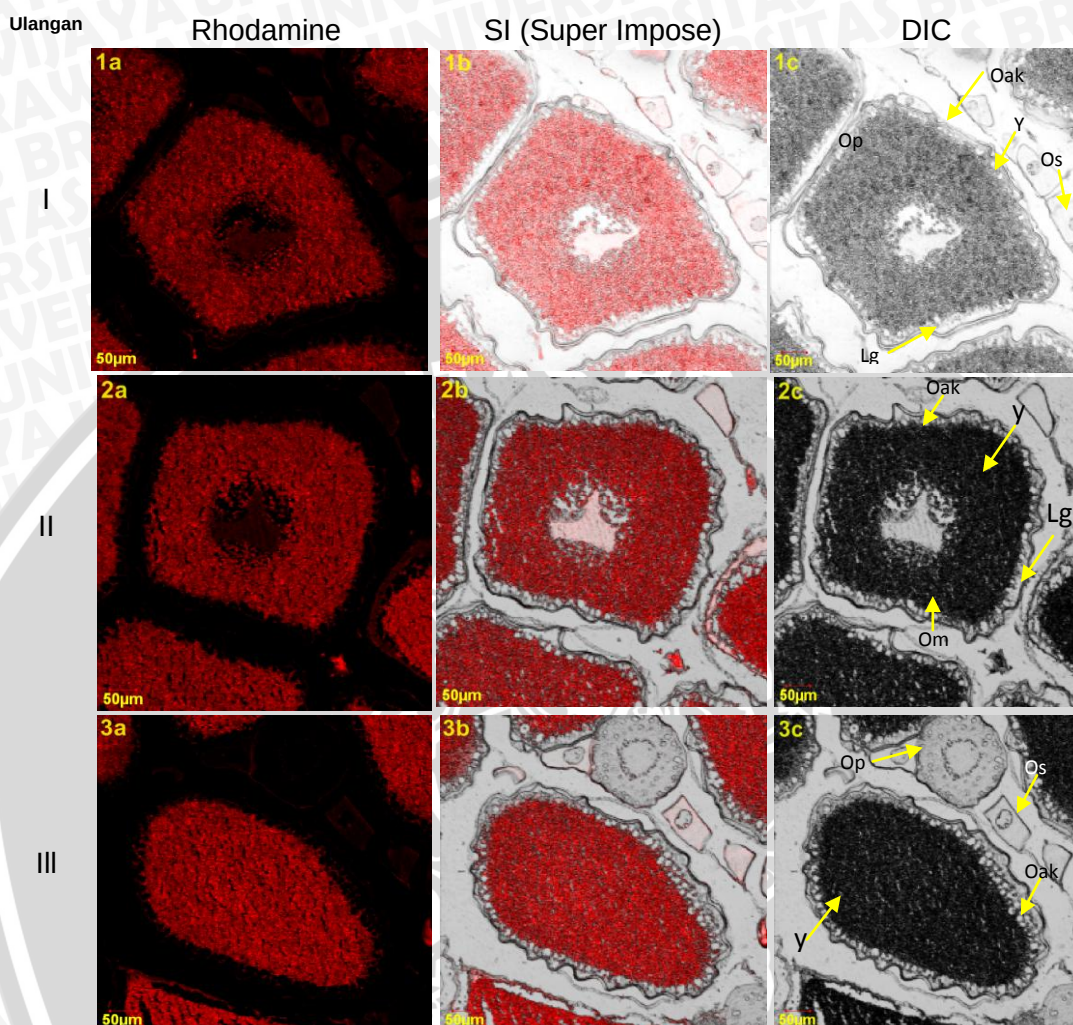
Pada Gambar 7 juga tampak adanya pendaran warna merah pada specimen gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina sungai Kalimas Surabaya yang telah diberi antibodi primer dan sekunder (berlabel). Antibodi primer yang digunakan adalah Anti 17- β Estradiol Mouse (Santacruz[®]), sedangkan antibodi sekundernya adalah Anti Mouse IgG-Rhodamine red X (KPL[®]). Pendaran warna merah menunjukkan bahwa protein estradiolnya terekspresi. Bagian yang gelap

atau tidak menunjukkan pendaran warna berarti pada bagian tersebut tidak ada hormon yang terekspresi. Pendaran warna merah ditunjukkan oleh gambar fluoresensi dengan Rhodamine (1a), (2a) dan (3a). Selanjutnya pada gambar (1b), (2b) dan (3b) menunjukkan *Super Impose* (SI) menampilkan bentuk gabungan dari *Fluoresensi* Rhodamine dan 3D dari DIC sehingga tampak lokalisasi hormon 17- β Estradiol yang tersebar pada spesimen gonad ikan tawes betina. Terakhir pada gambar (1c), (2c) dan (3c) terdapat gambar yang lebih detail berupa 3-dimensi hitam dan putih DIC (*Differential Interference Contrasts*).

Pada Gambar 8 gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan sungai Kalimas juga tampak adanya pendaran warna merah hampir di semua bagian ada. Pendaran ini ditunjukkan oleh gambar *fluoresensi* dengan Rhodamine (1a), (2a) dan (3a). Selanjutnya pada gambar (1b), (2b) dan (3b) menunjukkan *Super Impose* (SI) menampilkan bentuk gabungan dari *Fluoresensi* Rhodamine dan 3D dari DIC sehingga tampak lokalisasi hormon 17- β Estradiol yang tersebar pada spesimen gonad ikan tawes jantan. Terakhir pada gambar (1c), (2c) dan (3c) terdapat gambar yang lebih detail berupa 3-dimensi hitam dan putih DIC (*Differential Interference Contrasts*).

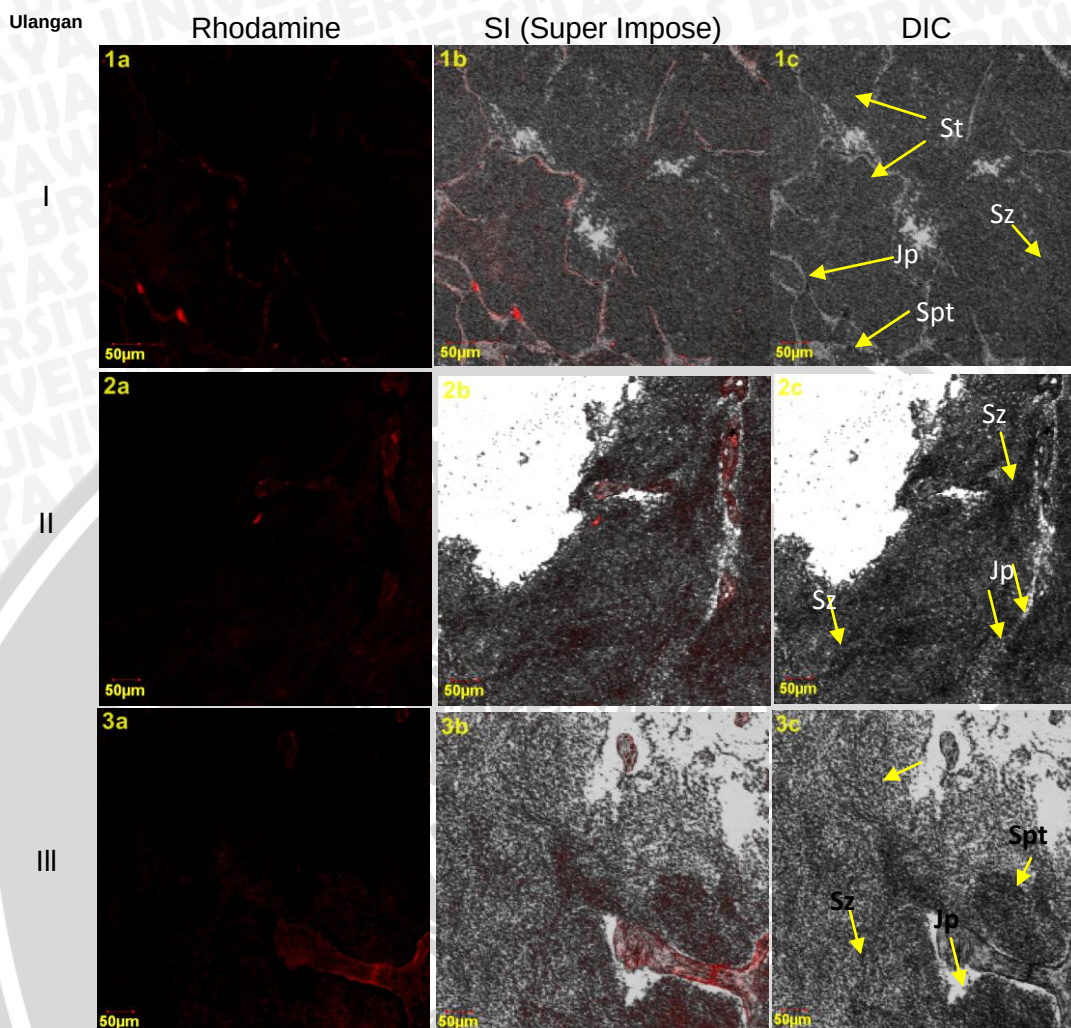
4.3.3 Gonad Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) Kontrol

a. Ikan Tawes Kontrol Betina



Gambar 9. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina kontrol dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) *Super Impose*; (1c) (2c) dan (3c) *Differential Interference Contrasts* (DIC). Pada DIC Oak=oosit alveoli; Op=oosit primer; Os=oosit sekunder; Om=oosit matang; Y=yolk (kuning telur); Lg=lipid globul. Perbesaran 200x dengan skala 50 μ m.

b. Ikan Tawes Kontrol Jantan



Gambar 10. Hasil pengamatan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan kontrol dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) *Super Impose*; (1c) (2c) dan (3c) *Differential Interference Contrasts* (DIC). Pada DIC Sp=sel spermatid; St=seminiferus tubules; Sz=spermatozoa; Jp=jaringan penghubung interstitial. Perbesaran 200x dengan skala 50 μ m.

Gambar 9 merupakan ekspresi 17- β estradiol pada gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina kontrol yang diambil pada perairan bersih. Pada ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina kontrol juga tampak adanya pendaran warna merah yang dapat muncul karena telah diberi antibodi primer dan sekunder (berlabel). Antibodi primer yang digunakan adalah Anti 17- β Estradiol Mouse (Santacruz[®]), sedangkan antibodi sekundernya adalah Anti Mouse IgG-

Rhodamine red X (KPL®). Pendaran warna merah menunjukkan bahwa protein estradiolnya berekspresi. Sedangkan bagian yang gelap atau tidak menunjukkan pendaran warna berarti pada bagian tersebut tidak ada hormon yang terekspresi. Pendaran warna merah ditunjukkan oleh gambar fluoresensi dengan Rhodamine (1a), (2a) dan (3a). Selanjutnya pada gambar (1b), (2b) dan (3b) menunjukkan *Super Impose* (SI) menampilkan bentuk gabungan dari *Fluoresensi* Rhodamine dan 3D dari DIC sehingga tampak lokalisasi hormon 17- β Estradiol yang tersebar pada spesimen gonad ikan tawes betina. Terakhir pada gambar (1c), (2c) dan (3c) terdapat gambar yang lebih detail berupa 3-dimensi hitam dan putih DIC (*Differential Interference Contrasts*).

Pada Gambar 10 gonad ikan tawes jantan kontrol di perairan bersih juga tampak adanya pendaran warna merah namun sedikit sekali yang terekspresi. Lebih banyak bagian yang tidak terekspresi dari pada yang terekspresi. Pendaran ini ditunjukkan oleh gambar *fluoresensi* dengan Rhodamine (1a), (2a) dan (3a). Selanjutnya pada gambar (1b), (2b) dan (3b) menunjukkan *Super Impose* (SI) menampilkan bentuk gabungan dari *Fluoresensi* Rhodamine dan 3D dari DIC sehingga tampak lokalisasi hormon 17- β Estradiol yang tersebar pada spesimen gonad ikan tawes jantan. Terakhir pada gambar (1c), (2c) dan (3c) terdapat gambar yang lebih detail berupa 3-dimensi hitam dan putih DIC (*Differential Interference Contrasts*).

Jika dibandingkan dengan gonad ikan tawes jantan di kedua sungai, tampak lebih sedikit ekspresi yang muncul pada gonad ikan tawes jantan kontrol. Hal ini mungkin karena habitat yang berbeda yang menyebabkan perbedaan ekspresi yang muncul. Gonad ikan tawes jantan kontrol diambil dari perairan bersih yang selalu terjaga kualitas airnya, sedangkan gonad ikan tawes jantan yang diambil dari kedua sungai kualitas airnya cenderung melebihi ambang

batas baku mutu kualitas air yang ditetapkan menurut PP No.82, 2001 dan telah dinyatakan tercemar.

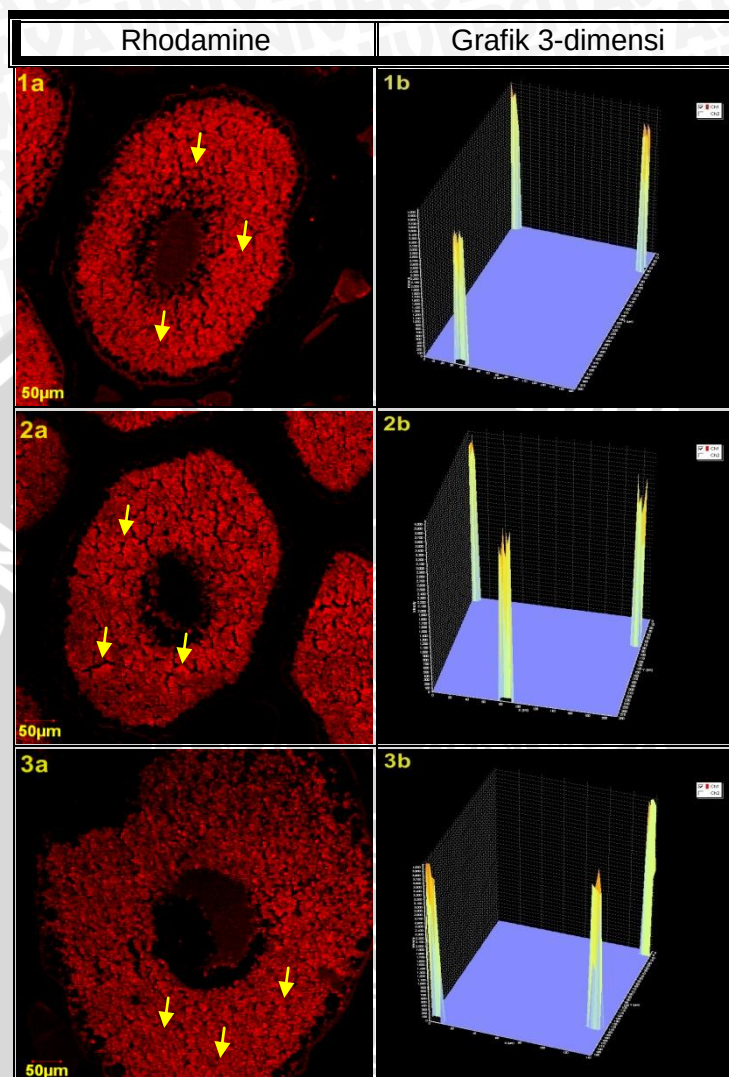
4.4 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol

Grafik ekspresi hormon 17- β estradiol dapat terlihat dengan menggunakan *Software Olympus Fluoview versi 1.7 A* dan didapatkan hasil grafik 3-dimensi dari hasil pendaran specimen seperti pada Gambar 11. Grafik tersebut menunjukkan letak koordinat dari 3 titik *fluoresensi* yang ada pada target pengamatan. Diambil 3 titik yang mewakili pendaran cahaya *fluoresensi* yang paling terang.

Berdasarkan dari grafik tersebut akan diketahui nilai kuantifikasi intensitasnya yang dapat dirubah menjadi file excel. Data yang diperoleh dalam bentuk grafik 3D memiliki tingkat kesulitan yang tinggi untuk dianalisa karena menampilkan intensitas yang sangat banyak dan berhimpit, maka dari itu dilakukan analisa data dengan cara yang lebih mudah yaitu dengan mengubah data hasil grafik 3D ke file excel. Data grafik yang dirubah dalam file excel akan diperoleh data intensitas yang akurat dan dapat dengan mudah untuk diidentifikasi. Berikut adalah gambar grafik 3-dimensi dari masing-masing sampel:

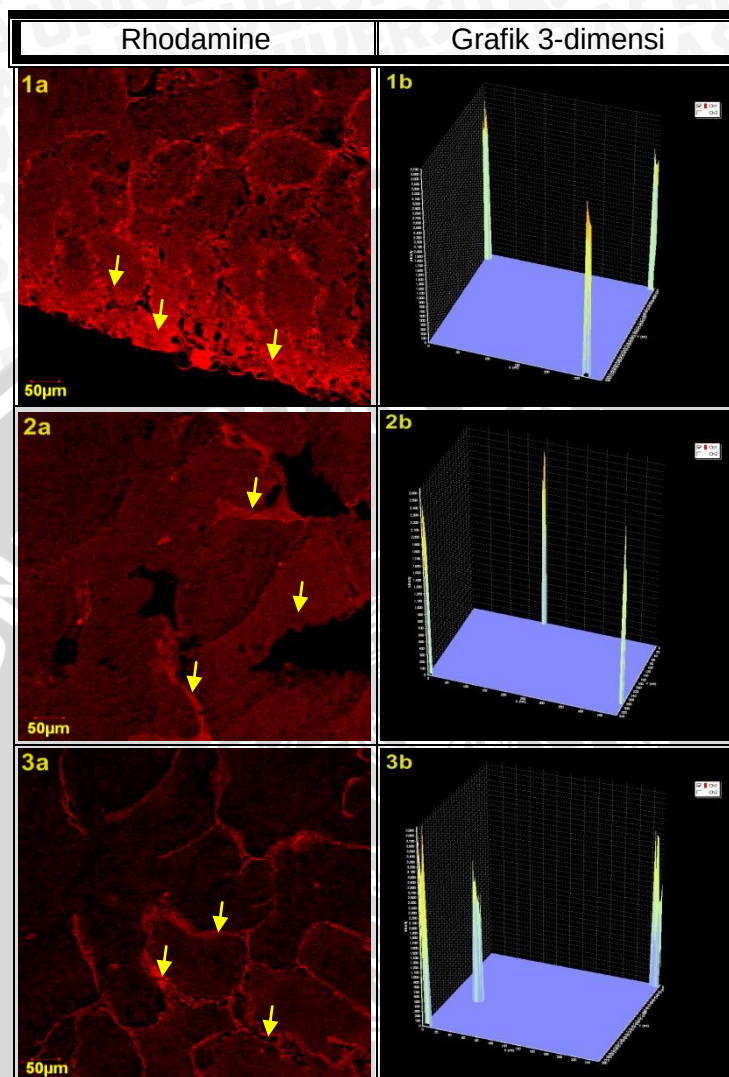
4.4.1 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol di Sungai Surabaya

a. Ikan Tawes Betina



Gambar 11. Hasil grafik 3-dimensi dari ekspresi hormon 17- β estradiol ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina di Sungai Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) grafik 3-dimensi.

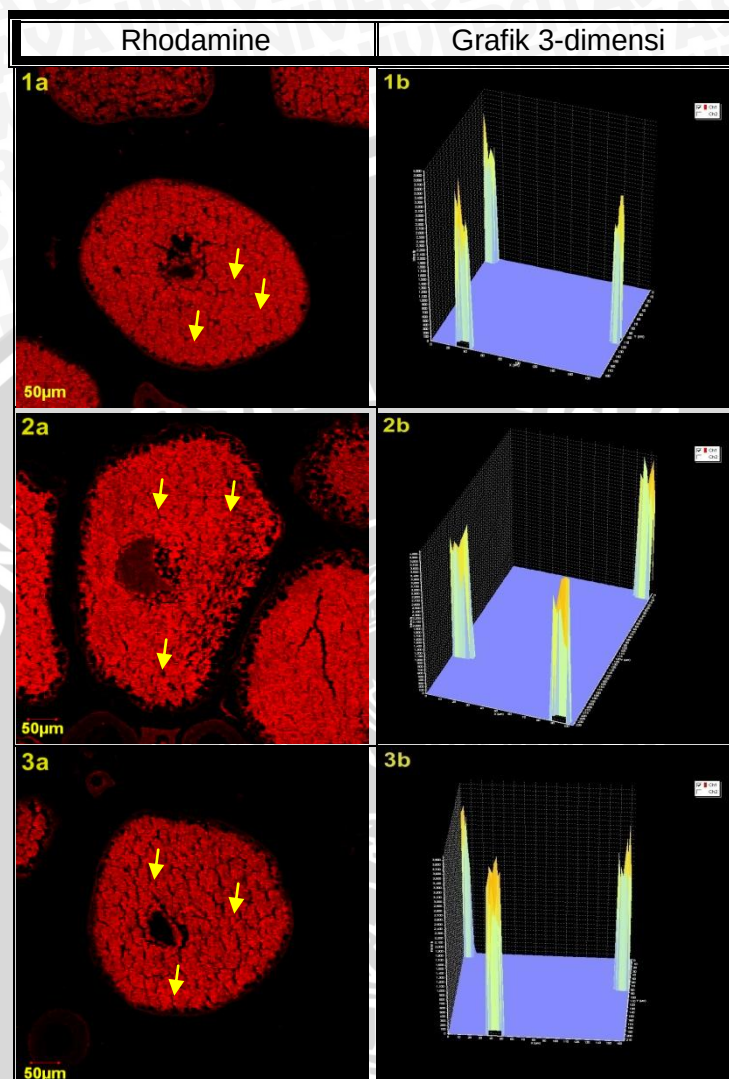
b. Ikan Tawes Jantan



Gambar 12. Hasil grafik 3-dimensi dari ekspresi hormon $17\text{-}\beta$ estradiol ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan di Sungai Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) grafik 3-dimensi.

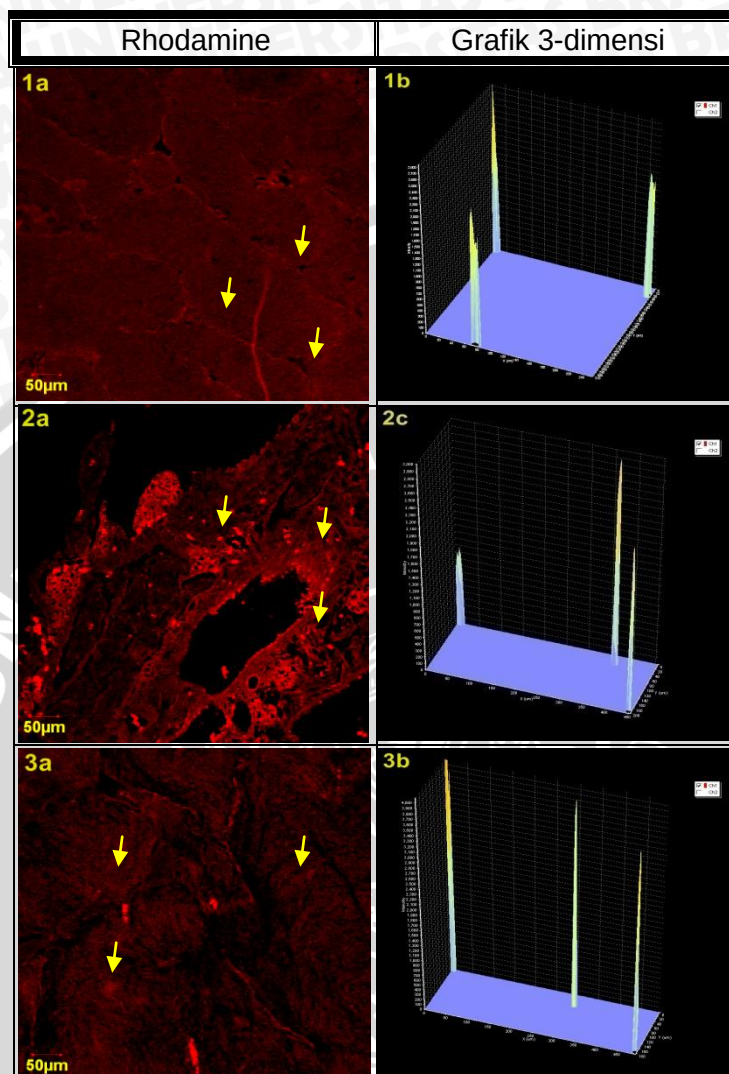
4.4.2 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol di Sungai Kalimas

a. Ikan Tawes Betina



Gambar 13. Hasil grafik 3-dimensi dari ekspresi hormon 17- β estradiol ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina di Sungai Kalimas Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) grafik 3-dimensi.

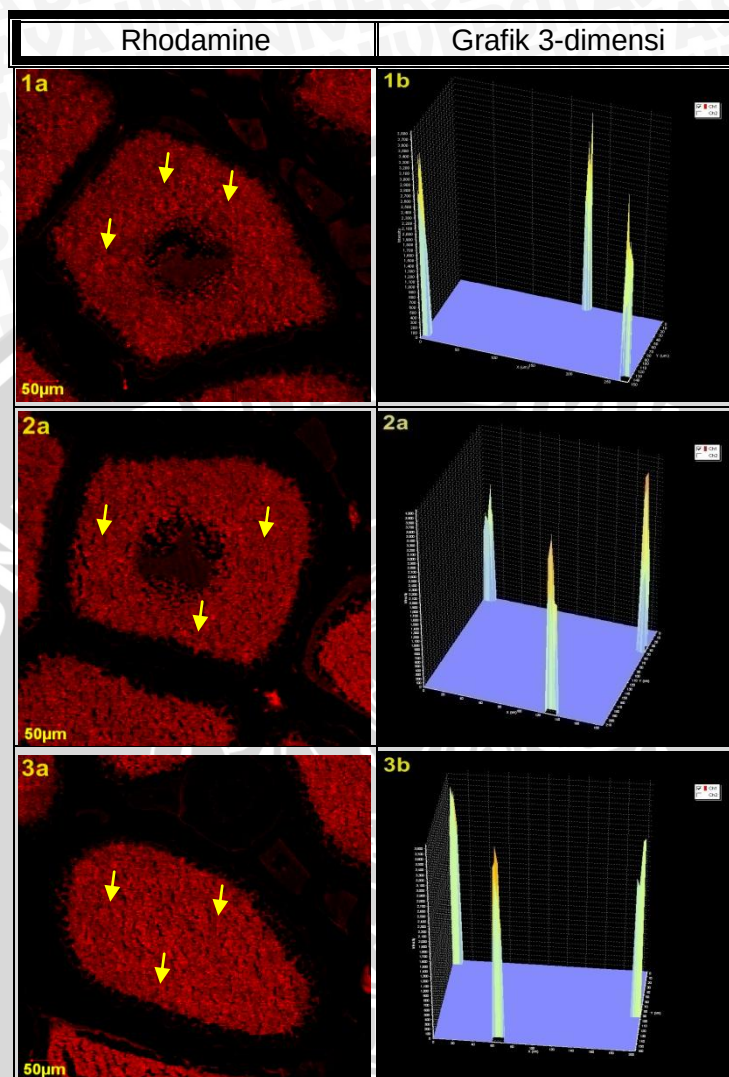
b. Ikan Tawes Jantan



Gambar 14. Hasil grafik 3-dimensi dari ekspresi hormon $17\text{-}\beta$ estradiol ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan di Sungai Kalimas Surabaya dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) grafik 3-dimensi.

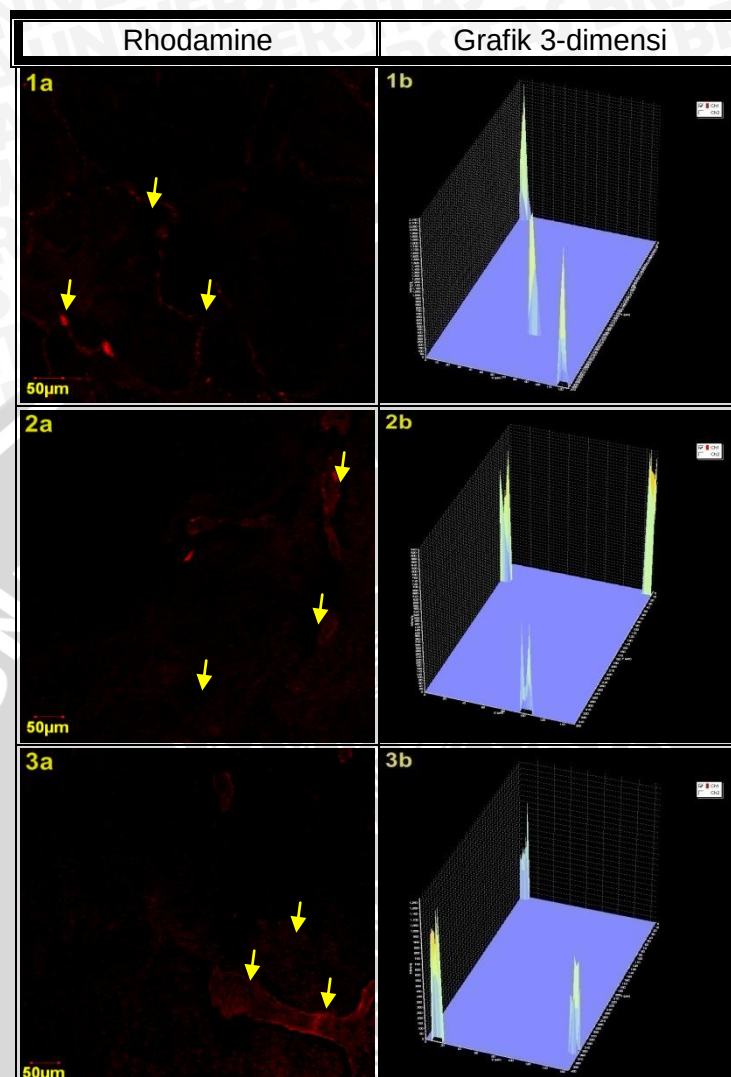
4.4.3 Grafik Ekspresi Hormon 17- β Estradiol pada Ikan Tawes Kontrol

a. Ikan Tawes Betina Kontrol



Gambar 15. Hasil grafik 3-dimensi dari ekspresi hormon 17- β estradiol ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina Kontrol dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) grafik 3-dimensi.

b. Ikan Tawes Jantan Kontrol



Gambar 16. Hasil grafik 3-dimensi dari ekspresi hormon 17- β estradiol ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan kontrol dengan software Olympus Fluoview versi 1.7 A (1a), (2a) dan (3a) fluoresensi dengan rhodamine; (1b), (2b) dan (3b) grafik 3-dimensi.

Grafik 3-dimensi diperoleh dari gambar hormon estradiol yang terekspresi dari masing-masing sampel. Gambar target yang terekspresi (ditunjuk dengan anak panah) dijadikan grafik 3-dimensi yang ditampilkan untuk melihat titik koordinat letaknya, selanjutnya nilai intensitas rata-ratanya akan disajikan dalam data excel. Pada grafik 3-dimensi tersebut terdapat 3 warna yang menunjukkan intensitas yaitu, warna biru menunjukkan intensitas yang rendah,

warna hijau menunjukkan intensitas sedang dan warna kuning menunjukkan intensitas yang tinggi. Pada Gambar 11, Gambar 13 dan Gambar 15 ikan tawes betina masing-masing lokasi menunjukkan grafik ekspresi yang sangat tinggi dan ditunjukkan dengan grafik berwarna kuning. Pada Gambar 12 dan Gambar 14 ikan tawes jantan dari sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya juga menunjukkan grafik intensitas yang tinggi, sebaliknya pada Gambar 16, grafik ikan kontrol jantan dari Balai menunjukkan grafik yang rendah dengan nampak banyaknya warna biru pada grafik 3-dimensi. Berbeda pada grafik ikan jantan yang ada pada sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya yang tergolong tinggi intensitasnya.

Selanjutnya untuk mendapatkan estimasi kuantitatif dengan menggunakan program “*Region Measurement*” berdasarkan intensitas pewarnaan relatif pada suatu region. Terdapat 9 preparat ikan betina dan 9 preparat ikan jantan dari semua lokasi, yaitu sungai Surabaya, sungai Kalimas, dan ikan kontrol yang diambil dari Balai. Setiap preparat atau sampel diambil 1 region *fluoresensi*. Masing-masing region diambil 3 titik yang mewakili pendaran cahaya *fluoresensi* (pendaran yang paling terang). Data yang didapatkan pada masing-masing titik *fluoresensi* di setiap region preparat ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina dan jantan dari sungai Surabaya, sungai Kalimas Surabaya dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 7 dan Tabel 8.

Tabel 7. Kuantifikasi preparat gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina

Lokasi	Sampel	Ulangan	Ekspresi 17- β estradiol (intensity/ μ m)		Rata-rata	Max	Min	StdDev
Sungai Sby	Betina	I	1	3629.37	3523.78	3726.25	3215.72	271.14
			2	3726.25				
			3	3215.72				
		II	1	3281.37	3319.63	3440	3237.54	106.51
			2	3237.54				
			3	3440				
		III	1	3297.92	3166.82	3297.92	3069	118.03
			2	3133.54				
			3	3069				
Rata-rata					3336.74			
StdDev					179.09			
Sungai Kalimas	Betina	I	1	2418	2738.81	2936.54	2418	280.32
			2	2936.54				
			3	2861.89				
		II	1	3179	3150.27	3365.9	2905.92	231.33
			2	2905.92				
			3	3365.9				
		III	1	1856.59	2563.09	3184.78	1856.59	668.14
			2	2647.92				
			3	3184.78				
Rata-Rata					2817.39			
StdDev					301.37			
Kontrol	Betina	I	1	2774.12	2394.75	2774.12	2064.90	357.19
			2	2345.23				
			3	2064.90				
		II	1	1513	2241.84	2673.37	1513	634.75
			2	2673.37				
			3	2539.15				
		III	1	2814.53	2800.20	2930.53	2655.53	138.05
			2	2655.53				
			3	2930.53				
Rata-Rata					2478.93			
StdDev					288.54			

Sumber data: Region Measurement

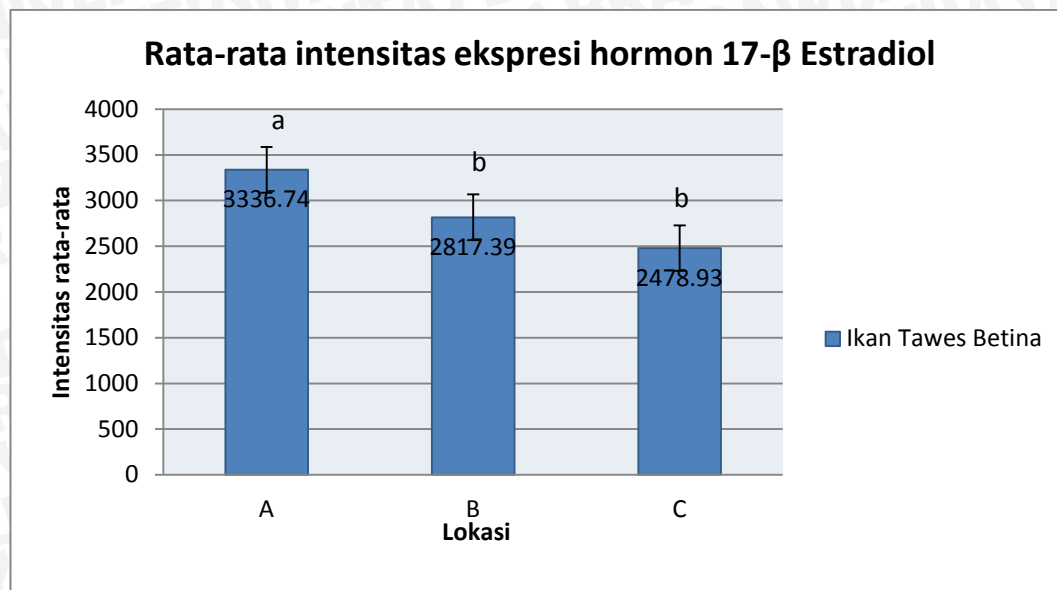
Tabel 8. Kuantifikasi preparat gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan

Lokasi	Sampel	Ulangan	Ekspresi 17- β estradiol (intensity/ μ m)		Rata-rata	Max	Min	StdDev
Sungai Sby	Jantan	I	1	2779.462	2730.05	3242.62	2168.07	538.97
			2	2168.07				
			3	3242.62				
		II	1	1790.23	1755.14	1794.81	1680.38	64.78
			2	1794.81				
			3	1680.38				
		III	1	1916.18	2027.16	2346.81	1818.5	281.10
			2	1818.5				
			3	2346.81				
Rata-rata					2170.78			
StdDev					503.07			
Sungai Kalimas	Jantan	I	1	1683.76	1772.91	1940.87	1683.76	145.55
			2	1694.09				
			3	1940.87				
		II	1	2135.36	1531.63	2135.36	843	650.35
			2	1616.54				
			3	843				
		III	1	2439.23	2542.05	2613.92	2439.23	91.36
			2	2613.92				
			3	2573				
Rata-rata					1948.86			
StdDev					527.68			
Kontrol	Jantan	I	1	1045	700.97	1045	423.30	316.11
			2	634.61				
			3	423.30				
		II	1	688.30	450.64	688.30	225.07	231.85
			2	438.53				
			3	225.07				
		III	1	891.07	599.14	891.07	392.53	259.99
			2	513.81				
			3	392.53				
Rata-rata					583.58			
StdDev					125.88			

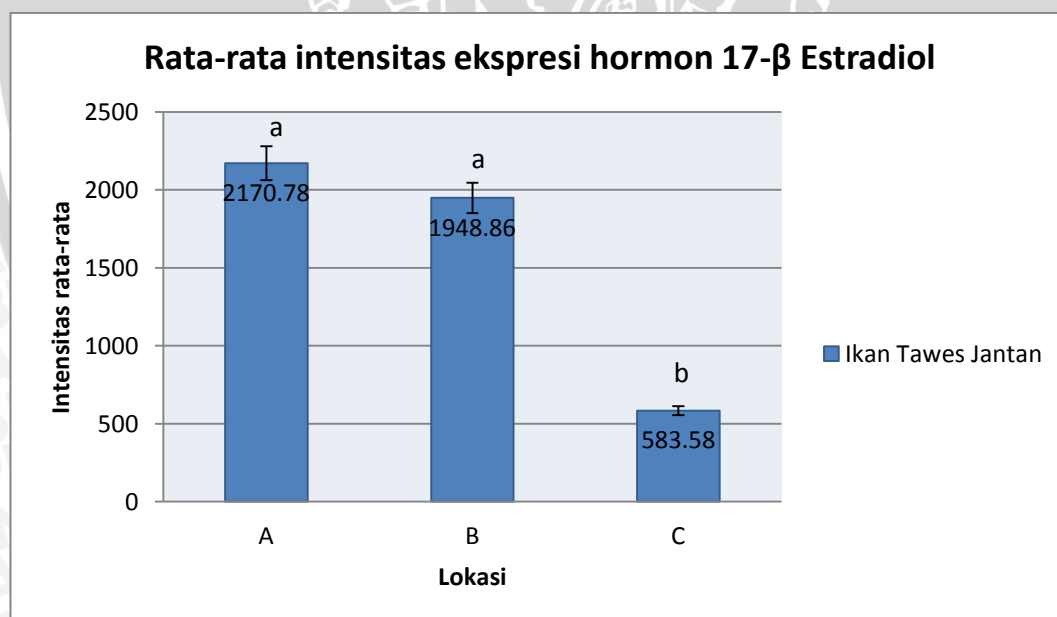
Sumber data: *Region Measurement*

Data tersebut diambil dari nilai rata-rata dari grafik yang telah dirubah menjadi data excel (Lampiran 4). Pada Lampiran 4 terdapat dua chanel rhodamin dan DIC (*Differential Interference Contrasts*) yang menghasilkan dua data intensitas rata-rata. Dalam analisa intensitas rata-rata yang diambil adalah data pada chanel 1 rhodamin. Secara umum analisis dari Tabel 7 menunjukkan hasil kuantifikasi intensitas rata-rata ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina pada sungai Surabaya, sungai Kalimas dan kontrol. Masing-masing preparat sampel gonad diambil 3 titik yang mewakili pendaran warna *fluoresensi* (pendaran yang paling terang). Data yang didapatkan pada intensitas ekspresi hormon 17- β estradiol rata-rata ikan tawes betina sungai Surabaya 3336.74 ± 179.09 intensity/ μm . Intensitas rata-rata ikan tawes betina sungai Kalimas 2817.39 ± 301.37 intensity/ μm . Intensitas rata-rata ikan tawes betina kontrol 2478.93 ± 288.54 intensity/ μm . Nilai intensitas rata-rata pada ekspresi hormon 17- β estradiol gonad ikan tawes betina dapat dilihat pada Gambar 17.

Tabel 8 menunjukkan hasil kuantifikasi intensitas rata-rata ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan pada sungai Surabaya, sungai Kalimas dan kontrol. Masing-masing sampel gonad diambil 3 titik yang mewakili pendaran warna *fluoresensi* (pendaran yang paling terang). Data yang didapatkan pada intensitas rata-rata ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan sungai Surabaya sebesar 2170.78 ± 503.07 intensity/ μm . Intensitas rata-rata ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan sungai Kalimas sebesar 1948.86 ± 527.68 intensity/ μm . Untuk intensitas rata-rata ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan kontrol sebesar 583.58 ± 125.88 intensity/ μm . Nilai intensitas rata-rata pada ekspresi hormon 17- β estradiol gonad ikan tawes jantan dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 17. Intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol dan standart deviasi dari gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina (A) sungai Surabaya dengan nilai rata-rata 3336.74 dan standart deviasi 179.09; (B) sungai Kalimas dengan nilai rata-rata 2817.38 dan standart deviasi 301.37; (C) Ikan kontrol dengan nilai rata-rata 2478.93 dan standart deviasi 288.54. Notasi didapatkan dari analisis statistik Uji BNT 5%



Gambar 18. Intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol dan standart deviasi dari gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan (A) sungai Surabaya dengan nilai rata-rata 2170.78 dan standart deviasi 503.07; (B) sungai Kalimas dengan nilai rata-rata 1948.86 dan standart deviasi 527.68; (C) Ikan kontrol dengan nilai rata-rata 583.58 dan standart deviasi 125.88. Notasi didapatkan dari analisis statistik Uji BNT 5%

Gambar 17 menunjukkan rata-rata intensitas ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes betina dari tiga lokasi dengan rata-rata tertinggi pada sungai Surabaya yaitu nilai intensitas rata-ratanya sebesar 3336,74 *intensity*/ μ m dengan standart deviasi 179,09. Rata-rata tertinggi kedua terdapat pada sungai Kalimas Surabaya yaitu sebesar 2817,38 *intensity*/ μ m dengan nilai standart deviasi 301,37 dan untuk ikan tawes betina kontrol mempunyai nilai intensitas rata-rata yang rendah yaitu 2478,93 *intensity*/ μ m dengan standart deviasi 288,54. Setelah di analisis statistik dengan menggunakan uji BNT 5% (Lampiran 5) didapatkan kesimpulan bahwa, intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol di sungai Surabaya berbeda nyata dengan ikan kontrol, sedangkan di sungai Kalimas Surabaya dianggap tidak berbeda nyata dengan ikan kontrol sehingga dapat dikatakan ikan di sungai Surabaya mempunyai rata-rata intensitas hormon 17- β estradiol yang tinggi.

17- β Estradiol adalah salah satu hormon steroid turunan kolesterol yang berperan penting dalam proses vitellogenesis. Estradiol merupakan hormon yang sangat penting yang dihasilkan oleh ovarium terutama pada ikan betina yang sedang mengalami proses vitellogenesis. Estradiol mengalami peningkatan secara bertahap pada fase vitellogenesis sejalan dengan meningkatnya ukuran diameter oosit. Adanya peningkatan konsentrasi estradiol dalam darah akan memacu hati melakukan proses vitellogenesis dan selanjutnya akan mempercepat proses pematangan gonad (Wang *et al.*, 2001). Fluktuasi hormon estradiol 17- β selama satu siklus estrus sejalan dengan perkembangan folikel dalam ovarium. Saat perkembangan folikel (fase folikular) hormon ini mengalami kenaikan secara bertahap, seiring perkembangan folikel primer menjadi folikel tersier. Puncak sekresi hormon estradiol terjadi sebelum terjadi ovulasi. Setelah terjadi ovulasi dan terbentuk korpus luteum pada ovarium (fase leuteal), hormon

ini mengalami penurunan secara bertahap sampai akhir fase leuteal (Sitasiwi, 2010).

Pada Gambar 18 menunjukkan rata-rata intensitas ekspresi hormon 17- β estradiol pada gonad ikan tawes jantan dari tiga lokasi menunjukkan bahwa pada lokasi sungai Surabaya dan sungai Kalimas tergolong tinggi, yaitu rata-ratanya intensitas hormon 17- β estradiol mencapai 2170.78 *intensity*/ μ m dengan standart deviasi 503,07 untuk sungai Surabaya dan 1948.86 *intensity*/ μ m untuk sungai Kalimas dengan standart deviasi 527,68. Berbeda halnya dengan ikan tawes kontrol yang diambil dari perairan bersih (kontrol) rata-rata intensitasnya hanya 583.58 *intensity*/ μ m dengan standart deviasi 125,88. Setelah di analisis statistik uji BNT 5% (Lampiran 5) diketahui bahwa, intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol di sungai Surabaya berbeda nyata dengan ikan kontrol, di sungai Kalimas Surabaya juga berbeda nyata dengan ikan kontrol, sehingga dapat dikatakan ikan di sungai Surabaya dan di Kalimas Surabaya mempunyai rata-rata intensitas hormon 17- β estradiol yang tinggi.

Nilai dari rata-rata intensitas ekspresi hormon 17- β estradiol ikan kontrol lebih lebih rendah daripada ikan tawes jantan dari kedua sungai tersebut, yang seharusnya hormon 17- β estradiol hanya ada pada ikan betina. Hal ini diperkuat dengan gambar ekspresi hormon 17- β estradiol pada ikan kontrol yang menunjukkan pendaran *fluoresensinya* sangat redup dan sedikit yang terekspresi (Gambar 10). Jika dibandingkan dengan nilai intensitas rata-rata hormon estradiol pada ikan kontrol, maka dapat dilihat adanya keabnormalan sintesis hormon estrogen di dalam tubuh ikan jantan. Kemungkinan besar ini disebabkan karena kondisi lingkungan yang estrogenik menyebabkan terdapatnya hormon 17- β estradiol pada ikan tawes jantan. Costa (2010) menambahkan 17- β estradiol (E2) mencapai lingkungan perairan melalui limbah domestik, limbah

ternak dan limbah pertanian, dan telah dilaporkan sebagai kontaminan lingkungan yang sangat ampuh. Sumber estrogen paling utama pada ekosistem perairan berasal dari limbah domestik karena memiliki konsentrasi lebih tinggi dari estradiol yang berasal dari obat-obatan manusia dan hewan. Berdasarkan studi literatur, sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya telah dinyatakan 'tercemar' dengan pencemaran dari kadar limbah organik dan logam berat yang berada diatas baku mutu kualitas air melebihi baku mutu yang telah ditetapkan menurut PP No.82, 2001.

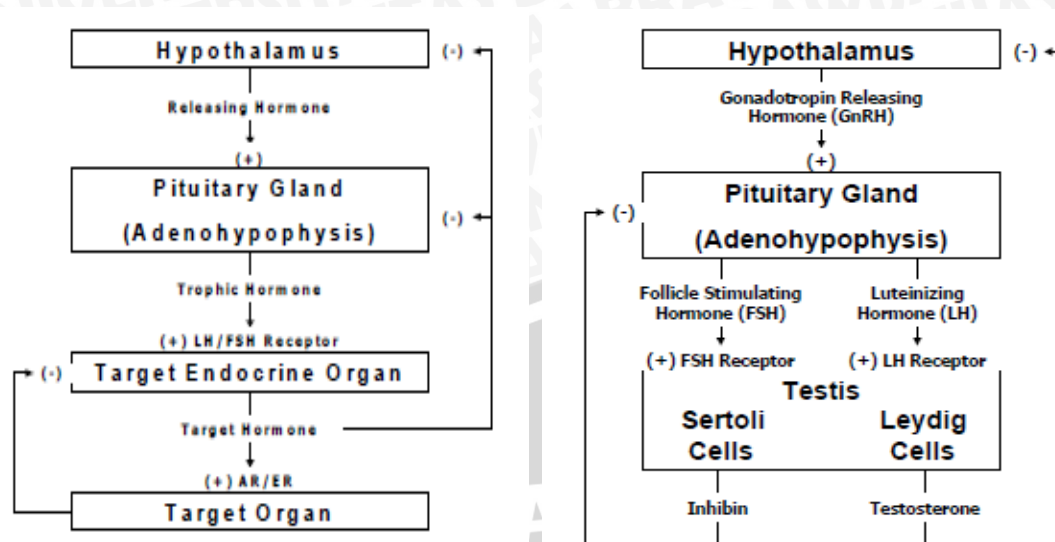
Hasil dari penelitian Juanda (2013) yang telah mengukur kadar estrogen di air sungai dengan menggunakan metode ELISA didapatkan hasil yang sangat tinggi yaitu 100 pg/ml pada sungai Surabaya dan 100 pg/ml pada sungai Kalimas Surabaya. Hal tersebut dikarenakan kondisi perairan kedua sungai sangat buruk dan telah dinyatakan tercemar. Data sekunder yang diperoleh dari studi literatur pada Tabel 17 menyatakan bahwa BOD, COD dan TSS dari sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya telah melebihi ambang batas baku mutu kualitas air yang telah ditetapkan. Pengukuran kualitas air yang dipantau Jasa Tirta pada bulan Maret 2014 menunjukan nilai TSS yang tinggi pada sungai Kalimas Surabaya sekitar 676,7 mg/l. COD 40,68 mg/l. dan BOD 6,93 mg/l sedangkan pada sungai Surabaya TSS 176 mg/l. COD 21,19 mg/l dan BOD 3,28 mg/l (Jasa Tirta, 2014). Tingginya konsentrasi bahan organik pada stasiun tersebut, dikarenakan pada lokasi ini memiliki beban masukan bahan organik yang cukup besar dari perumahan, perkotaan maupun industri di sekitar sungai, hal ini senada dengan pernyataan Fisesa (2014), bahwa tingginya nilai COD di perairan disebabkan oleh banyaknya bahan-bahan pencemar yang masuk ke perairan khususnya bahan pencemar organik dari limbah rumah tangga, industri, persawahan dan budidaya perairan. Effendi (2003) mengatakan bahwa nilai

COD pada perairan tidak tercemar biasanya kurang dari 20 mg/l, sedangkan pada perairan yang tercemar mencapai 200 mg/l. Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air tersebut telah melebihi ambang batas baku mutu kualitas air yang ditetapkan menurut PP No.82, 2001 (Lampiran 6).

Substansi yang paling berpotensi menyebabkan adanya feminisasi pada gonad jantan adalah hormone estrogen sintetis E2 (Estradiol). Substansi tersebut berpengaruh dalam pembentukan ovotestis pada saat ikan berada pada stadia larva (Arukwe dan Goksøyr, 1998). Hecker *et al.*, (2006) menambahkan bahwa konsentrasi hormon estrogen yang tinggi pada ikan jantan dikarenakan lingkungan yang estrogen dan dapat meng-estrogenkan ikan yang berasal dari senyawa-senyawa kimia seperti hormon estrogen sintetis, pestisida (DDT, DDE) dan logam-logam berat seperti kadmium, merkuri dan timbal sehingga akan menyebabkan terganggunya sekresi hormon di dalam tubuh ikan yang merupakan indikasi dari gangguan endokrin pada ikan. Dimana senyawa-senyawa tersebut berperan sebagai hormon tiruan yang dapat menyerupai hormon estrogen asli yang ada di dalam tubuh ikan sehingga akan mempengaruhi sekresi hormon di dalam tubuh ikan.

Menurut Arukwe dan Goksøyr (1998) beberapa *xenoestrogen* (senyawa-senyawa kimia yang estrogenik) adalah lipofilik dan hidrofobik yang mempunyai daya akumulasi tinggi di dalam jaringan tubuh biota perairan. *Xenoestrogen* yang berada di perairan akan masuk bersamaan dengan air pada saat ikan mengambil air melalui insang yang mempunyai membran epithelium, kemudian melalui serangkaian proses biokimia sehingga akan ditransfer ke dalam sistem aliran darah. Darah tersebut akan dialirkan langsung ke alat pencernaan yang kemudian akan diabsorpsi dan dibawa ke hati, sedangkan sebagian darah akan dialirkan langsung ke seluruh tubuh termasuk ke otak dan gonad (Pait dan Nelson, 2002). *Xenoestrogen* yang terbawa masuk ke dalam hati akan berperan

sebagai estrogen tiruan yang akan merusak reseptor-reseptor hormon yang ada dan mempengaruhi sinyal-sinyal pembentukan hormon di dalam hati. Di hati, estrogen berperan membawa pesan agar vitellogenin segera disintesis. Vitellogenin adalah bahan baku kuning telur yang disekresi sel-sel hati dan dibawa ke gonad oleh darah. Sedangkan *xenoestrogen* yang masuk ke dalam organ target yaitu gonad akan mengaktifkan reseptor-reseptor hormon estrogen yang ada pada gonad sehingga hipotalamus akan memberikan perintah untuk memproduksi hormon estrogen. Pada sintesis hormon seks pada ikan, hipotalamus akan melepaskan releasing hormon ke pituitari kemudian akan menghasilkan hormon GtH di dalam gonad yang diperintah untuk memproduksi hormon estrogen dan testosteron. Di dalam testis, regulasi hormon melibatkan koordinasi antar banyak sel dan jaringan yang berbeda. LH mengikat reseptor di dalam jaringan interstitial sel leydig untuk menstimulasi sintesis testosteron. FSH mengikat reseptor di sel sertoli yang merupakan faktor untuk pembentukan spermatogenesis. FSH juga meningkatkan jumlah reseptor LH di dalam testis yang akan meningkatkan produksi testosteron dan pertumbuhan testis. Sel sertoli mempunyai reseptor untuk FSH dan testosteron untuk mengkoordinasikan antara sel sertoli dan sel leydig di dalam testis. Sel sertoli memproduksi glykopeptida, inhibin dan memberikan *negative feedback* pada pelepasan FSH dari kelenjar pituitari. *Xenoestrogen* dari lingkungan ini akan masuk dan mengganggu pembentukan hormon testosteron yang dihasilkan di dalam testis dengan merusak reseptor-reseptor hormon yang ada pada setiap rangkaian pembentukan hormon tersebut. Sehingga sinyal-sinyal yang dikembalikan ke hipotalamus (*negative feedback*) menjadi terganggu (Juanda, 2013).



Gambar 19. Mekanisme feedback pada hipotalamus-pituitari-jaringan testis (Googleimage, 2014).

Beberapa studi tentang pengaruh buangan limbah industri terhadap sistem endokrin ikan yang telah banyak dilakukan dari peneliti terdahulu dapat ditabulasikan sebagai berikut:

Tabel 9. Tabulasi dari penelitian terdahulu

Spesies	Lokasi	Pencemar	Hormon	Metode	Referensi
Ikan Tawes (<i>Puntius javanicus</i>)	Sungai Surabaya, Kalimas dan Aloo	(studi literatur) limbah organik	Estrogen pada ikan jantan tertinggi mencapai 720 pg/ml dan di air sungai mencapai 100 pg/ml.	ELISA dan Hispatologi	Juanda, 2013
Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	Sungai Ishizu, Imba dan Teganuma Jepang	Senyawa-senyawa kimia	Kadar hormon estrogen pada ikan jantan di sungai Ishizu 653 pg/ml; sungai Imba 759 mg/l dan sungai Teganuma 234 mg/l Kadar hormon estrogen pada ikan mas betina sungai Ishzu	ELISA	Sumi <i>et al.</i> , 2007

			sebesar 558 pg/ml; sungai Imba 1520 pg/ml dan sungai Teganuma 262 pg/ml		
Ikan mosquitotis (<i>Gambusia affinis</i>)	Perairan tercemar Australia	Limbah domestik	Mosquitotish jantan mengalami perkembangan abnormal yaitu munculnya karakteristik sekunder (feminisasi)	Hispatologi	Batty dan Lim, 1999
Ikan <i>Rhamdia Quelen</i> (jundiá)	Treatmen lab. dengan pemberian dosis 17- β estradiol pada <i>Rhamdia Quelen</i> jantan	-	Diberi dosis E2 berbeda (0,1 mg kg ⁻¹ , 1 mg kg ⁻¹ dan 10 mg kg ⁻¹) Dan hasilnya ekspresi vitellogenin meningkat sesuai dengan dosis yang diberikan. Sementara pada ikan kontrol yang tidak di treatmen, tidak terdeteksi adanya vitellogenin	SDS PAGE dan Western blot	Costa et al., 2010
Ikan Betta (<i>Betta splendens</i>)	Treatmen lab. Dengan perendaman embrio dalam larutan 17- β estradiol ikan betta	-	Perendaman tersebut ternyata bisa meningkatkan presentase jenis kelamin betina dan lama perendaman 12 jam menghasilkan presentase yang tinggi	Perendam an dosis hormon 17- β estradiol sebesar 400 μ g/l	Purwati, 2004

4.5 Analisis Parameter Kualitas Air

Penelitian ini dilakukan pengamatan parameter kualitas air seperti suhu, pH, kecepatan arus, DO/Oksigen, dan TOM (Bahan Organik). Parameter kualitas air ini mendukung kehidupan ikan Tawes (*Puntius javanicus*). Pengukuran parameter kualitas air ini disajikan dalam Tabel 10.

Tabel 10. Data Analisis Kualitas Air

Lokasi	Parameter Kualitas Air				
	Suhu (°C)	pH	Kecepatan arus (m/s)	Oksigen (mg/l)	TOM
Sungai Surabaya	30,8	8,4	0,16	3,1	44,24
Sungai Kalimas	31	8,5	0,15	6,6	21,49
Balai Umbulan, Pasuruan	31	7,41	-	5,03	2,53
Baku Mutu Kualitas Air menurut PP No.82, 2001	28 – 32	6 – 8,5		≥ 6	≤50 SNI

Beberapa penelitian terdahulu di sungai Surabaya dan sungai Kalimas Surabaya, hasilnya menunjukkan rata-rata kualitas air telah melebihi baku mutu Kualitas Air menurut PP No.82 tahun 2001 (pada lampiran 6). Dapat dilihat data kualitas air masing-masing sungai pada Tabel 11.

Tabel 11. Data kualitas air dari penelitian terdahulu

Nama Sungai	Parameter	Terukur	Referensi	Baku mutu kualitas air PP No.82 tahun 2001 (mg/l)
Sungai Surabaya	Suhu (°C)	29	Jasa tirta, 2014	28 – 32 °C
		28	Juanda, 2013	
		32,3	Santoso, 2013	
	DO (mg/l)	3.76	Jasa tirta, 2014	≥ 6
		5,31	Juanda, 2013	
		5	Santoso, 2013	
		1,27-3,04	Febryanto, 2011	
		2,7-6,6	Suwari <i>et al</i> , 2010	
	pH	6.76	Jasa tirta, 2014	6 – 8,5
		7,3	Juanda, 2013	
		7	Febryanto, 2011	
		7	Febryanto, 2011	
	COD (mg/l)	21.19	Jasa tirta, 2014	≤ 10
		24-80	Febryanto, 2011	
		11,21-28,89	Suwari <i>et al</i> , 2010	
	BOD (mg/l)	3.82	Jasa tirta, 2014	≤ 2
		9-37	Febryanto, 2011	
		3,35-10,75	Suwari <i>et al</i> , 2010	
	TSS (mg/l)	176	Jasa tirta, 2014	≤ 50
		142-182	Febryanto, 2011	
		65,01	Suwari <i>et al</i> , 2011	
	TDS (mg/l)	212-242	Febryanto, 2011	≤1000
	TOM (mg/l)	8,25	Santoso, 2013	2-10 (mg/l) Effendie (2003)
Sungai Kalimas	Suhu (°C)	28.5	Jasa tirta, 2014	28 – 32 °C
		29	Juanda, 2013	
		31,1	Santoso, 2013	
	DO (mg/l)	3.1	Jasa tirta, 2014	≥ 6
		3,9	Juanda, 2013	
		3,5	Santoso, 2013	
		1,27-3,04	Putri <i>et al</i> , 2011	
		7.39	Jasa tirta, 2014	
	pH	7	Juanda, 2013	6 – 8,5
		7	Santoso, 2013	
		7	Santoso, 2013	
	COD (mg/l)	40.68	Jasa tirta, 2014	≤ 10
		16-60	Putri <i>et al</i> , 2011	
	BOD (mg/l)	6.93	Jasa tirta, 2014	≤ 2
		9-37	Putri <i>et al</i> , 2011	
	TSS (mg/l)	676.7	Jasa tirta, 2014	≤ 50
		142-182	Putri <i>et al</i> , 2011	

4.5.1 Suhu

Data hasil pengamatan kualitas air didapatkan suhu pada sungai Surabaya sebesar 30,8 °C dan pada sungai Kalimas Surabaya sebesar 31 °C.

Suhu ini lebih tinggi dibandingkan suhu pada sungai surabaya karena perairan di daerah ini tidak terdapat naungan sehingga cahaya matahari dapat langsung terserap oleh perairan. Meningkatnya suhu di perairan dipengaruhi oleh tingginya intensitas penyinaran. Ikan merupakan hewan eksotermik yang berarti tidak menghasilkan panas tubuh, sehingga suhu tubuhnya tergantung atau menyesuaikan pada suhu di lingkungan sekelilingnya. Ikan memiliki derajat toleransi terhadap suhu dengan kisaran tertentu yang sangat berperan bagi pertumbuhan, inkubasi telur, konversi pakan dan resistensi terhadap penyakit. Ikan akan mengalami stress manakala terpapar pada suhu di luar kisaran yang dapat ditoleransi. Kisaran toleransi suhu antara spesies ikan satu dengan lainnya berbeda (Irianto, 2005). Suhu yang optimal bagi pertumbuhan ikan tropis berkisar antara 25°C – 32°C (Effendi, 2003).

Variabel-variabel lingkungan seperti suhu dan cahaya dapat merangsang sistem organ endokrin dan aktivitas reproduksi seperti sekresi hormon gonadotropin oleh sel-sel pituitary yang mendukung perkembangan telur dan sperma dan menstimulasi produksi steroid androgen jantan dan steroid estrogen betina yang akan mengendalikan aktivitas dan tingkah laku reproduksi (Weatherley dan Gill 1989; Redding dan Patino 1993). Widodo *et al.*, (2013) menambahkan perubahan suhu air dapat mempengaruhi kecepatan metabolisme pada ikan. Daerah sub-tropis dan dingin suhu air erat kaitannya dengan radiasi matahari sehingga kedua faktor mempengaruhi proses biologis ikan seperti pematangan gonad, pemijahan dan penetasan telur di pembenihan ikan. Perubahan suhu yang terlalu ekstrim akan berdampak buruk terhadap ikan, misalnya stres dan ketika stress maka ikan akan mudah terserang penyakit. Sebaliknya apabila suhu terlalu rendah maka akan memperlambat proses metabolisme ikan dan nafsu makan ikan akan menurun.

4.5.2 Derajat Keasaman (pH)

Hasil pengamatan kualitas air didapatkan pH pada sungai Surabaya sebesar 8,4 dan di sungai Kalimas Surabaya sebesar 8,5. Besarnya nilai pH masih sesuai dengan baku mutu air tentang pengolahan kualitas air dan pengendalian pencemaran air berdasarkan PP No.82 tahun 2001, yaitu pH 6-9 sehingga masih dapat mendukung organisme sungai untuk bertahan hidup. mendukung kehidupan organisme adalah 5 – 9. Nilai pH dari sungai Surabaya dan Kalimas Surabaya menunjukkan angka yang normal sehingga metabolisme ikan masih berjalan normal. Hal ini senada dengan yang diungkapkan Purwandari (2013) yang menyatakan untuk mendukung kehidupan suatu organisme perairan secara wajar diperlukan nilai pH antara 5 sampai 8,7. Derajat keasaman (pH) mempunyai pengaruh yang besar terhadap tumbuhan dan hewan air. pH merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan ambang atas berbagai racun dan kisaran pH tergantung dari berbagai faktor antara lain suhu, konsentrasi dan oksigen terlarut. pH yang tidak signifikan akan mempengaruhi perkembangan gonad ikan (Widodo *et al.*, 2013)

4.4.3 Kecepatan Arus

Nilai kecepatan arus di kedua sungai dari hasil penelitian yaitu sungai Surabaya 0,16 m/s sedangkan sungai Kalimas Surabaya 0,15 m/s. Hal ini dikarenakan tipe substrat pada kedua sungai adalah berlumpur menyebabkan massa air semakin berat sehingga pergerakan arusnya lebih lambat. Substrat berlumpur terlihat dari keruhnya air pada sungai tersebut.

Menurut Welch (1980) bahwa kecepatan arus dapat dibagi menjadi lima kategori yaitu; arus sangat cepat (lebih dari 1 m/detik), arus cepat (0,51-1 m/detik), arus sedang (0,25-0,5 m/detik), arus lemah (0,1-0,25 m/detik), arus sangat lemah ($\leq 0,1$ m/detik). Kecepatan arus di sungai Surabaya dan Kalimas

Surabaya tergolong arus lemah. Hal ini akan mempengaruhi siklus reproduksi ikan di perairan.

4.4.4 Oksigen Terlarut (DO)

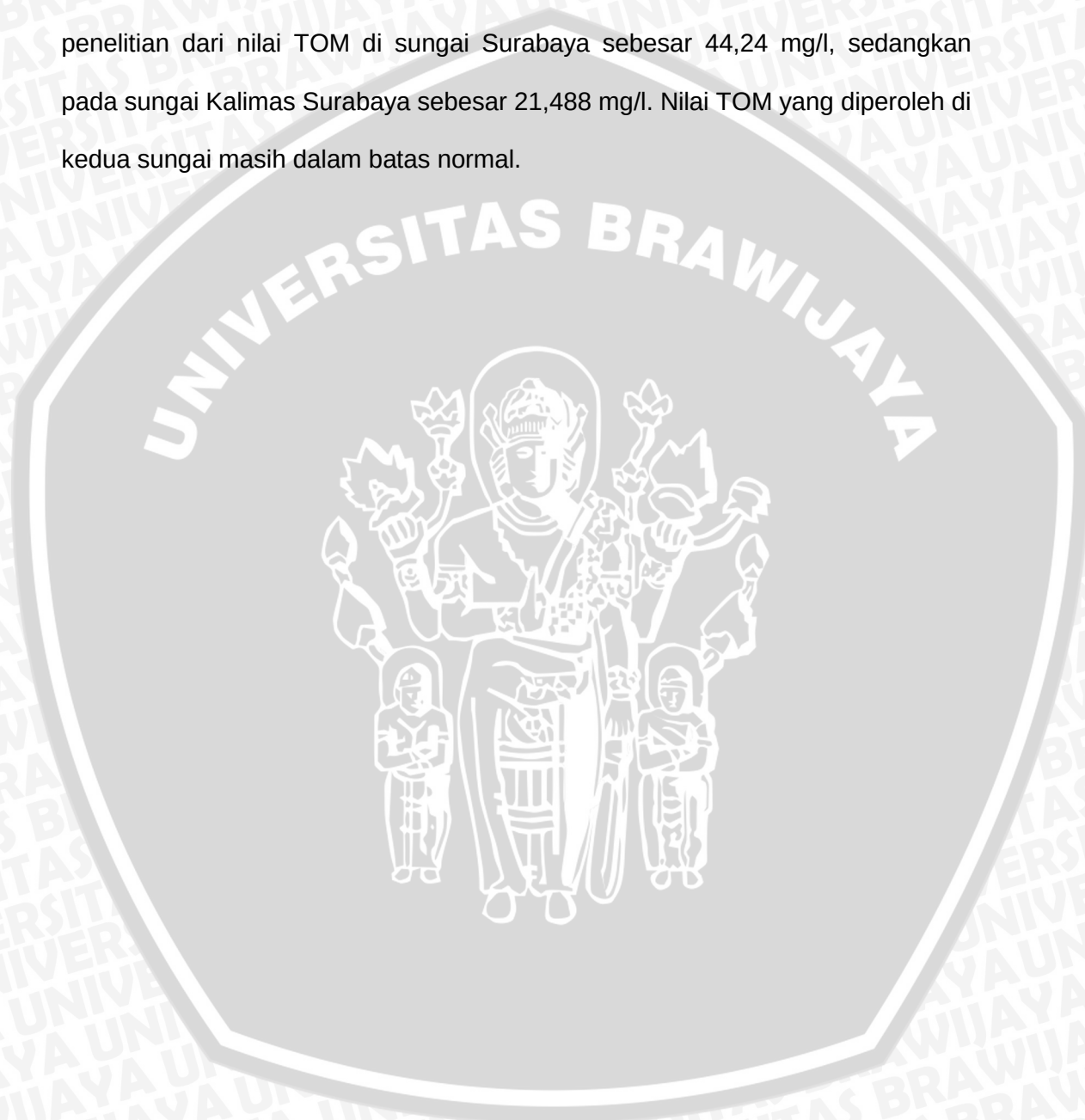
Menurut Kordi dan Andi (2007), oksigen adalah suatu jenis gas terlarut dalam air dengan jumlah yang sangat banyak. Oksigen merupakan salah satu factor pembatas, sehingga apabila ketersediaannya didalam air tidak mencukupi kebutuhan biota budidaya maka segala aktivitas biota akan terhambat. Biota air membutuhkan oksigen guna pembakaran bahan bakarnya (makanan) untuk menghasilkan aktivitas.

Berdasarkan hasil pengukuran dalam penelitian ini kandungan oksigen terlarut pada tiap tiap sungai berkisar antara 3,1 – 6,6 (mg/l) dimana kondisi ini masih memenuhi baku mutu yang ditetapkan menurut PP No.82 tahun 2001, yaitu ≥ 6 mg/l. Zooneveld *et al.*, (1991) menambahkan bahwa oksigen diperlukan ikan sebagai energi dalam metabolisme tubuh untuk dapat menghasilkan aktivitas seperti berenang, pertumbuhan, dan reproduksi. Konsumsi oksigen bagi ikan akan menurun dengan penurunan kandungan oksigen terlarut di perairan dimana kelarutan gas dalam air tergantung pada tekanan dan suhu. Kandungan oksigen di perairan yang baik untuk organisme air sebaiknya lebih 4 mg/l, sedangkan oksigen terlarut kurang dari 2 mg/l dapat menyebabkan kematian beberapa jenis ikan. Kandungan oksigen yang rendah di suatu perairan dapat disebabkan karena reduksi oksigen oleh bahan pencemar yang masuk ke perairan (Utomo *et al.*, 2008).

4.4.5 Total Bahan Organik (TOM)

Bahan organik total atau *Total Organic Mater* (TOM) menggambarkan kandungan bahan organik total suatu perairan yang terdiri dari bahan organik terlarut, tersuspensi (*particulate*) dan koloid (Hariadi *dkk*, 1992). Bahan organik

merupakan makanan utama bagi biota air. Khususnya moluska yang terbawa air atau berasal dari substrat di dalam perairan. Pada daerah pantai berpasir hanya sebagian kecil dari organisme yang menyerap bahan organik, baik yang terlarut maupun yang berukuran sangat kecil (Romimohtarto dan Juwana, 2001). Hasil penelitian dari nilai TOM di sungai Surabaya sebesar 44,24 mg/l, sedangkan pada sungai Kalimas Surabaya sebesar 21,488 mg/l. Nilai TOM yang diperoleh di kedua sungai masih dalam batas normal.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekspresi ditunjukkan dengan adanya pendaran warna merah pada spesimen gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*), yang menunjukkan terekspresinya protein estradiol.
2. Nilai rata-rata intensitas ekspresi hormone 17- β estradiol gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) betina di sungai Surabaya, sungai Kalimas dan kontrol didapatkan hasil 3336,74; 2817,39; dan 2478,93 intensity/ μm . Untuk nilai rata-rata intensitas ekspresi hormone 17- β estradiol gonad ikan tawes (*Puntius javanicus*) jantan di sungai Surabaya, sungai Kalimas dan kontrol didapatkan hasil 2170,78; 1948,86; dan 583,58 intensity/ μm .

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap pengukuran tingkat pencemaran kualitas perairan yang berpengaruh langsung pada system endokrin ikan tawes (*Puntius javanicus*) yang berada di kedua sungai tersebut, dan perlu adanya batasan ketentuan rata-rata intensitas hormone 17- β estradiol pada gonad ikan tawes betina maupun jantan jika digunakan dalam indikator pencemaran gangguan fungsi endokrin atau yang biasa disebut EDC (*Endocrine Disrupting Chemical*) dan juga diperlukan pengukuran fluktuasi intensitas rata-rata yang normal tiap perkembangan tingkat kematangan gonad.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, Ruswana. 2005. Sintesis, Fungsi dan Interpretasi Pemeriksaan Hormon Reproduksi. Disampaikan pada pertemuan Fertilisasi Endokrinologi Reproduksi bagian Obstetri dan Ginekologi RSHS/FKUP Bandung.
- Arukwe, A dan A. Goksøyr. 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *J.Sarsia*, 83:225-241.
- Azwar, S. 1997. Metode Penelitian. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Azwir, 2006. Analisa Pencemaran Air Sungai Tapung Kiri oleh Limbah Industry Kelapa Sawit PT.Paputra Masterindo Kabupaten kampar. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Barouk, S., T. Hintz, P. Li, A.M. Duffy, N.J. Maclusky, dan H.E. Scharfman. 2011. 17 β -Estradiol Increases Astrocytic Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) in Adult Female Rat Hippocampus. *Endocrinology*.
- Barus. 2002. Pengantar Limnologi. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sumatra Utara. Medan
- Batty, J and R.Lim. 1999. Morphological and reproductive characteristics of male Mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia. *J.Environ Contam Toxicol*, 36:301-307.
- BeyondPesticides. 2010. Pesticides and Endocrine Disruption: Hormon disruptors unregulated in the marketplace. <http://www.beyondpesticides.org>. Diakses pada tanggal 05-04-2013
- Calaf, G.M dan D. Roy. 2010. Gene and Protein Expressions Induced by 17 β -estradiol and Parathion in Cultured Breast Epithelial Cells. *Mol Med*, 13(5-6): 255–265.
- Cornish Daryl A. 1998. Seasonal Steroid Hormone Profiles in Plasma and Gonads of the Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Water SA* Vol.24(3):0378-4738.
- Costa, D.D Moura, Neto F. Filipak, Costa M.D.M., Morais R.N., Garcia J.R.E., Esquivel B.M., dan Ribeiro C.A.O. 2010. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151:248-257
- DPU [Departemen Pekerjaan Umum, Direktorat Jendral Sumber Daya Air]. 2008. Profil Balai Besar Wilayah Sungai Brantas.
- Effendi, Hefni. 2003. Telaah Kualitas Air, Bagi Pengelolaan Sumber Daya Dan Lingkungan Perairan. Kanisus. Yogyakarta.
- Falconer IR, Chapman HF, Moore MR, dan Ranmuthugala G. 2006. Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environ. Toxicol* (21) 181-191

Fujaya, Yushinta. 2008. FISILOGI IKAN Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta.

Giddabasappa, A., M. Bauler, M. Yepuru, E. Chaum, J.T. Dalton, dan J. Eswaraka. 2010. 17- β Estradiol Protects ARPE-19 Cells from Oxidative Stress through Estrogen Receptor- β . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51** (10): 5278-5287.

Googleimage. 2013. ikan tawes *Puntius javanicus*. www.googleimage.com/puntius+javanicus/org/. Diakses tanggal 2 Januari 2014

Granner, D.K. 2003. Biokimia Harper. Edisi 25. Terjemahan: dr. Andry H. Jakarta: Penerbit Kedokteran EGC.

Hecker, M., M.B. Murphy, K.K. Coady, D.L. Villeneuve, P.D. Jones, J.A. Carr, K.R. Solomon, E.E. Smith, G.V.D. Kraak, T. Gross, L.D. Preez, R.J. Kendall dan J.P. Giesy. 2006. Terminology of Gonadal Anomalies in Fish and Amphibians Resulting from Chemical Exposure. *Rev J. Environ Contam Toxicol*, 187: 103-131.

Hutagalung HP. 1984. Logam berat dalam lingkungan laut. *Pewarta Oseana*. Vol IX. No.1. LON LIPI. Jakarta.

Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gajah Mada University press. Yogyakarta. 256 hal.

Jabarsyah, H.A, J.Cabyadi, D.Usman. 2011. Aspek Reproduksi Ikan Bali (*Apurion verescens*) Diperairan Pulau Darawan dan Sekitarnya. *Jurnal penelitian Universitas Borneo Tarakan*.

Jasa Tirta, 2007. Kualitas Air Sungai di Wilayah Sungai Brantas. Malang: Laboratorium PTJ-I.

Jelks, K.B, R. Wylie, C.L. Floyd, A.K. McAllister, dan P. Wise. 2007. Estradiol Targets Synaptic Proteins to Induce Glutamatergic Synapse Formation in Cultured Hippocampal Neurons: Critical Role of Estrogen Receptor- α . *The Journal of Neuroscience*, **27** (26): 6903– 6913

Juanda, S.J. 2013. Hispatologi Gonad dan Kadar Hormon Estrogen Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) di Sungai Surabaya, Kalimas Surabaya dan Sungai Aloo Sidoarjo. Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Juvancz Zoltan, S. Barna, D. Gyarmathy, F. Konorot. 2008. Studi of Endocrine Disrupting Chemicals in Environment. *Acta Polytechnica Hungarica* **5** (3).

Kime, D.E, M.Ebrahim dan K.Nysten. 1996. Use of computer assist sperm analysis (CASA) for monitoring the effect of pollution on sperm quality of fish application to effect of heavy metals. *Aqua Toxicol*: 36-327.

Kominfo Jatim. 2013. Dinas Komunikasi dan Informasi Jawa Timur: Pencemaran Kalimas Surabaya, Jasa Tirta DIminta Terbitkan Kualitas Air Sungai Secara Periodik. Diterbitkan 28 Januari 2011.

Kordi.M.G.H dan A.B.Tancung. 2007 .Pengelolaan Kualitas Air, Rineka Cipta. Jakarta.

Kottelat, M., J.A Whitten, N.S. Kartikasari and S. Wirjoatmodjo. 1993. Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Dalhousie University. Canada.

Larson, D.G. Joakim, M.A. Erci dan P.Thomas. 2005. Characterization of Putative Ligands for a Fish Gonadal Androgen Receptor in a Pulp Mill Effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 25(2): 419-427

Liney, K.E, Jobling S., Stears, J.A., Simpsons, P., Tyler, C.R. 2005. Assessing the Sensitivity of Different live Stage for Sexual Disruption in Roach (*Rutilus rutilus*) Exposed to Effluentr from Wastewater Treatment Works. *Environmental Health Perspectives*. Vol.113 (10) 1299-1307

Lukman, T. Suryono, T. Crishmadha, M. Fakhrudin dan J. Sudarso. 2008. Struktur Komunitas Biota Bentik dan Kaitannya dengan Karakter Sedimen di Danau Limbato, Sulawesi. *Oceanologi dan Limnologi di Indonesia*, **34** (3) 473-493

Man, B.G., J. Min, E.J. Kim. 2002. Toxicity Monitoring and Classification of Endocrine Disrupting Chemichals (EDCs) Recombinant Bioluminescent Bacteria. *Chemosphere*, 46: 289-294

Marina, M.P dan C.B.R Martinez. 2007. Histopatology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichtiology* **5**(3): 327-336.

Masduqi, A. dan E. Apriliani. 2008. Estimation of Surabaya River Water Quality Using Kalman Filter Algorithm. *The Journal for Technology and Science*, **19** (3): 87-91.

Mason. 1999. Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity. Akademy Press. New York.

Mays, L.W. 1996. Water Resources Handbook. McGraw-Hill. New York. San Fransisco. Washington. Auckland. Lisbon. Bogota. Tokyo. Singapore.

Mulyanto. 2008. Metode Sampling. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Musfiqon, HM. 2012. Metodologi Penelitian Pendidikan. Prestasi Pustaka. Jakarta

Nazari R. Mohammad. 2010. Plasma sex steroid hormones of Persian sturgeon *Acipenser persicus* as influenced by gonad development stages and season. *International Aquatic Research* 2:49-54

Olympus Corporation. 2009. <http://www.olympusconfocal.com>. Diakses pada 13-03-2013

Pait, A.S and J.O Nelson, 2002. Endocrine Disruption in Fish.An Assesement of Recent Research and Result. Centre for Coastal Monitoring and Assesement. *National Centres for Coastal Ocean Science*. National Ocean Service US.

- Pandango, M.E. 2010. Studi Keberadaan Nano Partikel pada Limbah Padat Hasil Terapi Balur dengan CLSM. Jurusan Fisika. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Pawley, J.B., Ed. 2006. Handbook of Biological Confocal Microscopy (3rd ed). Springer Berlin.
- Peraturan Pemerintah No. 82. 2001. Pengelolaan Kualitas air dan Pengendalian Pencemaran Air. Jakarta.
- Potalangi, N., M. Toelihere, M. Zairin dan Eddy Supriyono. 2004. Pengaruh Pemberian Hormon aLH-RH Melalui Emulsi W/O/W LG (C14) Pada Perkembangan Gonad Induk Ikan Jambal Siam (*Pangasius hypophthalmus*). Jurnal Akuakultur Indonesia, **3**(3): 15-21
- Purwandari, N. 2013. Pengamatan Kondisi Hematology Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) yang Tertangkap di DAS dan Bengawan Solo Madiun Jawa Timur. Skripsi FPIK Universitas Brawijaya Malang. (tidak diterbitkan)
- Putri, N.A, N.Abdulgani dan N.Triyani. 2011. Biomonitoring in situ Kalimas Surabaya menggunakan Perubahan Hispatologis Insang Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*). Skripsi. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. ITS. Surabaya.
- Prahitama, A. 2013. Estimasi Kandungan DO (Dissolved Oxygen) di Kali Surabaya dengan Metode Kriging. Jurnal Statistika, Vol.1 (2) November 2013.
- Priyono, T.S, E.Yuliani, R.W.Sayekti. 2011. Studi Penentuan Status Mutu Air Sungai Surabaya untuk Keperluan Bahan Baku Air Minum. Jurnal Teknik Pengairan. Vol.4(1): 53-60.
- Richardson, S.R.M., V.J. Kramer, S.D. Fitzgerald, J.A. Render, B. Yamini, S.J. Barbee, J.P. Giesy. 1999. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Aquatic Toxicology, 47: 129-145
- Romimohtarto, K dan Juwana, Sri. 2001. Pola penerbit Djambatan. Jakarta.
- Sabet S.S., Imanpoor M.R., dan Fatideh B.A. 2009. Relation between gonadal hormones and sexual maturity of female *Kutum Rutilus frisii kutum* during spawning season. Journal of cell and molecular research 1(2):97-105
- Santoso, D.R. 2013. Level Residu Organoklorin pada Ikan dari Sungai Aloo, Sungai Porong, Kalimas dan Sungai Surabaya di Propinsi Jawa Timur. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Brawijaya. Malang.
- Semwogerere, D. dan E.R Weeks. 2005. Confocal Microscopy. Emory University, Atlanta, Georgia, U.S.A.
- S Claxton, N., T.J Faller dan Davidson, M.W. 2007. Laser Scanning Confocal Microscopy The Florida State University. Florida.
- Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N.E. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?. *The Lancet*, 341: 1392 - 1396

- Shobikhuliatul, J.J, S. Andayani, J. Couteau, Y. Risjani, C. Minier. 2013. Some Aspect of Reproductive Biology on the Effect of Pollution on the Histopathology of Gonads in *Puntius Javanicus* from Mas River, Surabaya, Indonesia. *Journal of Biology and Life Science*, **4** (2): 191-205
- Singh, Ruchi, A.K. Singh, M. Tripathi. 2012. Melatonin Induced Changes in Specific Growth Rate, Gonadal Maturity, Lipid and Protein Production in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, **25** (1): 37-43
- Solang M. dan Lamondo D. 2009. Peningkatan Pertumbuhan dan Indeks Kematangan Gonad Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* L.) Melalui Pemotongan Sirip Ekor. *Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan*. Vol 19(3): 143-149
- Soyano, K. Jun-ya Aoki, Y.Itashiki, K.Don Lee, In-Kyu Yeo, J.Zhong. 2010. Contamnant by endocrine disrupting chemicals in coastal waters of the east China sea. *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, Eds.,A.Ishimatsu and H-J.Lie, 215-226.
- Sumi, M., Y.Kawashima, T.Fukumaki, H. Ishibashi, K. Arizono, T.Iguchi dan M.Shimizu. 2007. Comparison of serum vitellogenin, steroid hormone, gonad histopathology and bioacumulation in Common Carp (*Cyprinus carpio*) of two Rivers and a Lake in Japan: potential for endocrine disruption. *J.Environmental Science*,14(1):41-54.
- Sumpter.J.P. 2002.Endocrine Disruption in the Aquatic Encironment. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. **3**, Part M Endocrine Disruptors, Part II. Springer. Berlin.
- Suryabrata, Sumadi. 2010. Metodologi Penelitian. Rajawali pers: Jakarta
- Suryanto, A.M. 2011. Pencemaran Lingkungan (Sumber, Dampak, dan Upaya Penanggulangannya). Diktat Kuliah Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Suwari, E. Riani, B. Pramudya, I. Djuita. 2011. Model Dinamik Pengendalian Pencemaran Air Kali Surabaya. 234-247
- Tortora, G.J. 2001. Microbiology: An Introduction. USA: Addison Wesley Longman Inc.
- Tugiyono dan N.Nurcahyani. 2011. Biomonitoring of Effect Following Exposure of Fish to Sugar Refinery Effluent. *Journal Modern Applied Science*. Vol.5(5)
- Utomo, Y., Sudarmadji, Sudibyakto dan E. Sugiharto. 2008. Analisis kromium dalam sedimen sebagai parameter kualitas air kadar kromium pada perairan di Sungai Surabaya. *Semniar Nasional Fundamental dan Aplikasi Teknik Kimia.ITS*.
- Wang, H-Y., C-Weng, M-C. TU dan S-C. Lee. 2001. Synchronization of plasma sexual steroid concentrations and gonadal cycles in the sleeper (Eleotris acanthapoma). *Zoological Studies*, **40** (1):14-20.

Weleh, E.B. 1980. Ecological Effect of Waste Water. Cambridge Perss. Combridge. 381 hlm.

Widodo M.S., Marsoedi, Trinil S. dan Agung P.W.M. 2013. Maturity level and somatic Index of Gonado at Dwarf Snake-head (*Channa gachua*) during January to December 2009. Journal of Basic and Applied Scientific Research. 3(3):387-393

Winter, Allison. 2009. Estrogen in Waterways Worse Than Thought. <http://www.scientificamerican.com>. Diakses pada tanggal 17-07-2013.

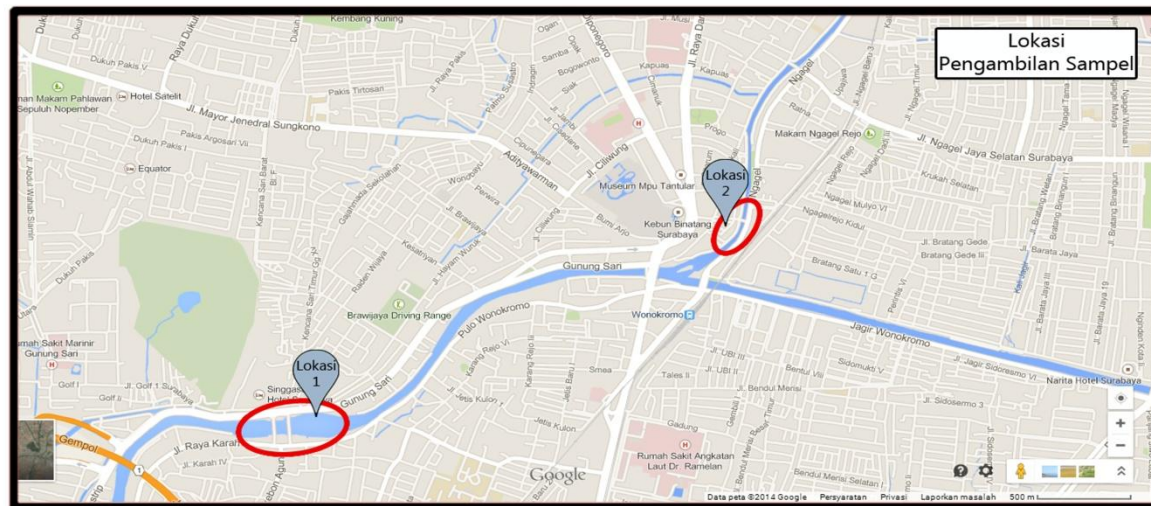
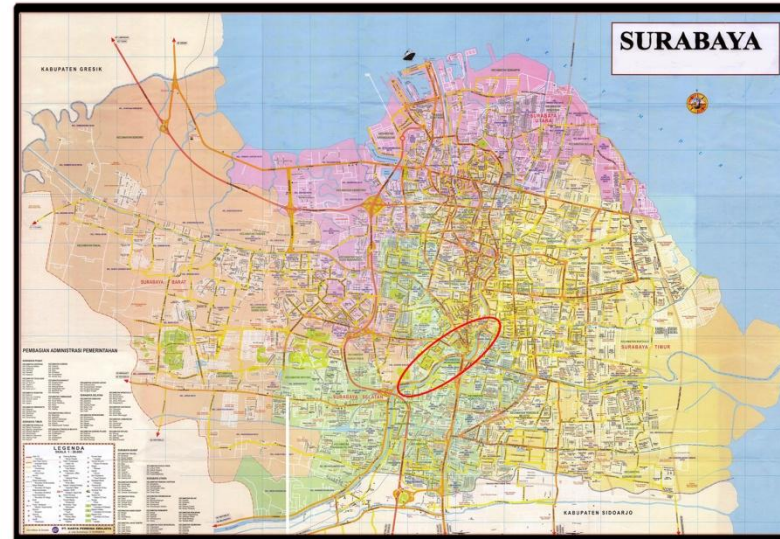
Woo S, H-Y. Jeon, T-K. Lee, S-R. Kim and S-H. Lee. 2011. Expression Profiling of Liver in Java Medaka Fish Exposed to 17- β Estradiol. Original Paper. Mol Cell Toxicol(2011) 7:271-281.

Zairin, M. 1997. Aktivasi proses vitelogenesis untuk pematangan gonad ikan balashark (*Balantiocheilus melanopterus* Bleeker) betina. *Biosfera : majalah ilmiah biologi*, 6

Zipcodezoo, 2013. Klasifikasi Ikan Tawes. Animals/ *Puntius javanicus*. <http://www.zipcodezoo.org>. Diakses 25 Desember 2013.



Peta Lokasi Pengambilan Sampel Ikan Tawes (*Puntius javanicus*)



Lampiran 2. Alat dan Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

Alat dan Bahan

- Alat yang digunakan dalam penelitian adalah:
- a) Alat-alat untuk pengambilam sampel ikan tawes (*Puntius javanicus*):

No.	Alat	Kegunaan
1.	Jala Pancing	Mengambil ikan dari sungai
2.	Sectio set	Mengambil gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>)
3.	Botol film	Wadah gonad yang diberi formalin 10%
4.	Timbangan	Menimbang berat ikan dan berat gonad ikan
5.	Alat Tulis	Mencatat data-data yang dibutuhkan
6.	Penggaris	Mengukur panjang total (TL) tubuh ikan tawes
7.	Kamera Digital	Mendokumentasikan pengamatan
8.	Botol Aqua	Wadah larutan formalin 10%

- b) Alat-alat untuk analisis kualitas air antara lain:

No.	Alat	Kegunaan
1.	DO meter	Mengukur Oksigen terlarut yang ada di dalam perairan
2.	pH meter	Mengukur pH perairan sungai Surabaya dan Kalimas
3.	Pipet tetes	Mengambil larutan dalam skala kecil
4.	Washing Bottle	Wadah aquades
5.	Erlemeyer	Wadah air sample
6.	Buret	Digunakan dalam titrasi sampel
7.	Statif	Digunakan untuk menyangga buret
8.	Hot plate	Tempat memanaskan air sampel menjadi kerak
9.	Stirer	Membantu mempercepat pengadukan
10.	Botol Aqua	Mengukur kecepatan arus
11.	Tali	Mengikat totol aqua
12.	Bola hisap	Menghisap dan mengeluarkan larutan berbahaya

- c). Alat-alat lain yang digunakan dalam proses preparasi histologi dan imunofluoresence

No.	Alat	Kegunaan
1.	Confocal (CLSM)	Pengamatan ekspresi hormone 17- β Estradiol
2.	Microwave	Pemanas yang berfungsi menghilangkan larutan berbahaya

3.	Jar	Wadah preparat yang diberi larutan
4.	Micropipet	Mengambil larutan dalam skala mikro
5.	Timbangan analitik	Menimbang bahan
6.	Tabung ukur 100ml	Wadah larutan etanol 90% dan 70%
7.	Tuperware kecil	Tempat pewarnaan imunofluoresence
8.	Botol gelap	Wadah larutan PBS
9.	Botol terang	Wadah larutan xylol
10.	Cup	Wadah antibody primer dan antibody sekunder
11.	pH meter	Membuat larutan menjadi pH tertentu
12.	Stopwatch	Menghitung waktu
13.	Pinset	Mengambil preparat dalam Jar
14.	Autoclave	Mensterilkan alat-alat yang akan digunakan
15.	Erlemeyer	Wadah larutan dalam skala banyak 250ml

- Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

a) Bahan yang digunakan dalam *imunofluoresence*:

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>)	Diambil gonadnya dan di pereparasi histologi sebelum di imunofluoresence
2.	Formalin 10%	Mengawetkan gonad supaya masih dalam keadaan fresh saat di histologi
3.	PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> untuk pewarnaan imunohistokimia
4.	BSA	<i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i> digunakan sebagai larutan penyangga
5.	Etanol absolute	Sebagai larutan yang digunakan dalam Deparafinasi sampel
6.	Xylol	Sebagai larutan yang digunakan dalam Deparafinasi sampel
7.	Alkohol	Mensterilkan tangan dari kuman dan bakteri
8.	Aquadest	Digunakan untuk mengkalibrasi alat
9.	Anti 17- β Estradiol Mouse (Santacruz)	Antibody primer dalam pelabelan imunofluoresence
10.	Antibodi sekuner (anti mouse igG - rhodamine red x)	Antibody sekunder dalam pelabelan imunofluoresence
12.	Kertas label	Memberi penamaan pada sampel

13.	Bahan-bahan lain yang digunakan dalam proses pengamatan preparasi histologi dan imunofluoresence
-----	--

b) Bahan-bahan kimia untuk analisis kualitas air:

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Air sampel	Sampel yang akan diukur kualitas airnya
2.	KmNO ₄	Sebagai oksidator/pengikat bahan organik
3.	H ₂ SO ₄	Sebagai katalisator dan pengkondisian asam
4.	Na-oxalate	Sebagai reduktor
5.	Kertas label	Menandai sampel
6.	Tissue	Membersihkan alat
7.	Aquadest	Sebagai nilai y



Lampiran 3. Perhitungan Gonad

Somatic Index (GSI)

a.) GSI gonad ikan tawes sungai Surabaya

- Betina

$$GSI (I) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{1,64}{170} \times 100\%$$

$$= 0,96$$

$$GSI (II) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{8,42}{230} \times 100\%$$

$$= 3,66$$

$$GSI (III) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{25,81}{210} \times 100\%$$

$$= 12,2$$

- Jantan

$$GSI (I) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{1,48}{120} \times 100\%$$

$$= 1,2$$

$$GSI (II) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{1,23}{125} \times 100\%$$

$$= 0,98$$

$$GSI (III) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{3,21}{170} \times 100\%$$

$$= 1,88$$

b.) GSI gonad ikan tawes sungai Kalimas Surabaya

- Betina

$$GSI (I) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{1,20}{190} \times 100\%$$

$$= 0,63$$

$$GSI (II) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{3,52}{220} \times 100\%$$

$$= 1,6$$

$$GSI (III) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{32,57}{270} \times 100\%$$

$$= 12$$

- Jantan

$$GSI (I) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{0,69}{110} \times 100\%$$

$$= 0,62$$

$$GSI (II) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{1,23}{125} \times 100\%$$

$$= 0,97$$

$$GSI (III) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{3,24}{200} \times 100\%$$

$$= 1,62$$

$$GSI (III) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{14,58}{380} \times 100\%$$

$$= 3,8$$

c.) GSI gonad ikan tawes
Kontrol (Balai Umbulan,
Pasuruan)

- Betina

$$GSI (I) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{2,88}{250} \times 100\%$$

$$= 1,15$$

$$GSI (II) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{3,41}{280} \times 100\%$$

$$= 1,21$$

$$GSI (III) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{34,98}{300} \times 100\%$$

$$= 11,6$$

- Jantan

$$GSI (I) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

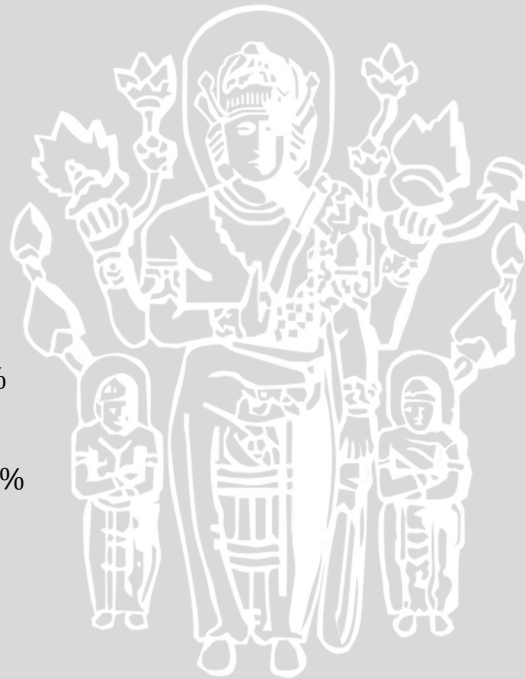
$$= \frac{13,69}{380} \times 100\%$$

$$= 3,6$$

$$GSI (II) = \frac{Wg}{w} \times 100\%$$

$$= \frac{5,09}{300} \times 100\%$$

$$= 1,6$$



Lampiran 4. Data Kuantifikasi Intensitas Hormon 17-β Estradiol

Region Measurement - Ikan Tawes I Betina Sungai Surabaya estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	329.26	302.76	105.08	36.521	43197	3523.8	3991.7	2756	1235.7	365.5	1096.5	183	16.061	118.33	0	118.33	36.935	110.81
Max	421.21	538	121.25	39.034	70746	3726.3	4095	3085	1532	413.85	1241.6	292	36.5	201	0	201	67.72	203.16
Min	264.65	161.53	97	35.264	29035	3215.7	3787	2255	1008	310.65	931.94	0	0	0	0	0	0	0
Range	156.56	376.48	24.25	3.77	41711	510.52	308	830	524	103.21	309.62	292	36.5	201	0	201	67.72	203.16
StdDev	81.779	205.09	14.001	2.177	23861	271.15	177.25	440.92	268.66	51.909	155.73	159.45	18.64	105.14	0	105.14	34.276	102.83
3StdDev	245.34	615.28	42.002	6.53	71584	813.44	531.75	1322.8	805.99	155.73	467.18	478.34	55.919	315.42	0	315.42	102.83	308.49
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	264.65	161.53	97	35.264	29035	3629.4	4093	3085	1008	310.65	931.94	0	0	0	0	0	0	0
3	421.21	208.74	97	35.264	29810	3726.3	4095	2928	1167	372	1116	292	36.5	154	0	154	67.72	203.16
4	301.93	538	121.25	39.034	70746	3215.7	3787	2255	1532	413.85	1241.6	257	11.682	201	0	201	43.086	129.26

Region Measurement - Ikan Tawes II Betina Sungai Surabaya estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	308.14	336.3	103.47	36.671	36675	3319.6	3992.3	2582.3	1410	458.89	1376.7	1502	141.25	414.67	6.667	408	136.03	408.09
Max	417.48	493.27	116.4	39.501	48160	3440	4095	2765	1594	478.67	1436	1609	166.63	597	20	597	191.68	575.04
Min	212.47	221.17	97	35.248	26251	3237.5	3825	2463	1060	435.82	1307.5	1333	114.93	279	0	279	99.508	298.52
Range	205.01	272.11	19.4	4.252	21909	202.46	270	302	534	42.849	128.55	276	51.696	318	20	318	92.173	276.52
StdDev	103.19	140.79	11.201	2.451	10993	106.51	146.16	160.65	303.24	21.613	64.84	148.08	25.861	164.06	11.547	167.28	48.974	146.92
3StdDev	309.56	422.38	33.602	7.352	32979	319.54	438.47	481.96	909.73	64.84	194.52	444.23	77.583	492.17	34.641	501.83	146.92	440.76
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	212.47	221.17	97	35.264	26251	3281.4	3825	2765	1060	435.82	1307.5	1333	166.63	597	0	597	191.68	575.04
3	417.48	294.47	97	35.248	35613	3237.5	4057	2463	1594	478.67	1436	1564	142.18	368	20	348	116.9	350.7
4	294.47	493.27	116.4	39.501	48160	3440	4095	2519	1576	462.18	1386.5	1609	114.93	279	0	279	99.508	298.52

Region Measurement - Ikan Tawes III Betina Sungai Surabaya estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	422.45	419.14	90.534	33.908	37034	3166.8	4091	1557.7	2533.3	835.67	2507	7826	665.39	1525	92.333	1432.7	485.28	1455.8
Max	469.67	495.76	97	35.248	42873	3297.9	4095	1941	2940	946.48	2839.4	9882	760.15	1560	189	1536	557	1671
Min	335.48	310.63	77.6	31.227	33759	3069	4083	1143	2154	714.66	2144	6428	584.36	1479	0	1290	398.65	1196
Range	134.19	185.13	19.4	4.021	9114	228.92	12	798	786	231.83	695.47	3454	175.79	81	189	246	158.35	475.05
StdDev	75.415	96.599	11.201	2.322	5069.5	118.03	6.928	399.92	393.71	116.25	348.75	1818.6	88.698	41.605	94.574	127.63	80.22	240.66
3StdDev	226.24	289.8	33.602	6.965	15208	354.1	20.785	1199.8	1181.1	348.75	1046.2	5455.8	266.09	124.82	283.72	382.89	240.66	721.98
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	469.67	310.63	77.6	31.227	42873	3297.9	4095	1941	2154	714.66	2144	9882	760.15	1479	189	1290	398.65	1196
3	335.48	495.76	97	35.248	34469	3133.5	4095	1589	2506	845.88	2537.6	7168	651.64	1560	88	1472	500.18	1500.6
4	462.21	451.03	97	35.248	33759	3069	4083	1143	2940	946.48	2839.4	6428	584.36	1536	0	1536	557	1671

Region Measurement - Ikan Tawes I Betina Sungai Kalimas estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:3

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	320.98	378.96	137.42	41.832	40177	2738.8	3679.7	1604	2075.7	556.97	1670.9	3317.7	227.42	579.33	65.667	513.67	150.55	451.66
Max	432.39	462.21	169.75	47.216	54376	2936.5	4009	1994	2440	657.97	1973.9	4552	325.14	1016	79	948	278.54	835.61
Min	249.74	283.29	97	35.248	32302	2418	3464	1126	1470	426.22	1278.7	1903	173	289	50	210	67.543	202.63
Range	182.65	178.92	72.75	11.968	22074	518.55	545	868	970	231.75	695.25	2649	152.14	727	29	738	211	632.98
StdDev	97.727	90.105	37.043	6.073	12321	280.33	289.74	440.64	528.12	118.7	356.11	1333.7	84.816	384.96	14.64	385.96	112.46	337.38
3StdDev	293.18	270.31	111.13	18.22	36964	840.99	869.21	1321.9	1584.3	356.11	1068.3	4001	254.45	1154.9	43.92	1157.9	337.38	1012.1
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
1	249.74	283.29	145.5	43.032	33852	2418	3566	1126	2440	657.97	1973.9	4552	325.14	1016	68	948	278.54	835.61
2	432.39	391.39	97	35.248	32302	2936.5	3464	1994	1470	426.22	1278.7	1903	173	289	79	210	67.543	202.63
3	280.81	462.21	169.75	47.216	54376	2861.9	4009	1692	2317	586.72	1760.1	3498	184.11	433	50	383	105.58	316.73

Region Measurement - Ikan Tawes II Betina Sungai Kalimas estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Radius	Diameter	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	253.5	334.2	111.6	37.93	6.212	12.43	49215	3150	3914	2214	1699	489.3	1468	4222	253.5	751	47	704	200.7	602
Max	287	433.6	121.3	39.5	6.212	12.43	69938	3366	4095	2302	1794	565.9	1698	6557	340.7	937	112	829	244.5	733.6
Min	192.6	205	97	35.25	6.212	12.43	37025	2906	3572	2040	1532	438.6	1316	1340	121.8	458	0	458	168.2	504.7
Range	94.43	228.6	24.25	4.252	0	0	32913	460	523	262	262	127.3	381.8	5217	218.9	479	112	371	76.31	228.9
StdDev	52.82	117.2	12.83	2.332	0	0	18039	231.3	296.1	151	145.3	67.48	202.4	2651	116	256.8	58.13	213.1	39.42	118.3
3StdDev	158.5	351.6	38.5	6.996	0	0	54118	694	888.2	452.9	436	202.4	607.3	7954	348.1	770.4	174.4	639.2	118.3	354.8
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Radius	Diameter	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	287	205	121.3	39.03	6.212	12.43	69938	3179	4074	2302	1772	463.4	1390	6557	298	937	112	825	189.2	567.6
3	192.6	364.1	116.4	39.5			40683	2906	3572	2040	1532	438.6	1316	4770	340.7	858	29	829	244.5	733.6
4	280.8	433.6	97	35.25			37025	3366	4095	2301	1794	565.9	1698	1340	121.8	458	0	458	168.2	504.7

Region Measurement - Ikan Tawes III Betina Sungai Kalimas estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:3

	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Radius	Diameter	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	297.8	328	127.7	40.52	6.212	12.43	40834	2563	3721	1157	2563	775.2	2326	6342	337.4	1026	78.67	947.7	281.4	844.3
Max	386.4	439.8	145.5	43.03	6.212	12.43	44587	3185	3994	1850	3443	1160	3480	13355	607	2232	107	2160	626.9	1881
Min	234.8	234.8	116.4	39.03	6.212	12.43	37071	1857	3443	0	2103	559.4	1678	2640	188.6	409	57	302	95.89	287.7
Range	151.6	205	29.1	3.998	0	0	7516	1328	551	1850	1340	600.7	1802	10715	418.5	1823	50	1858	531	1593
StdDev	78.99	103.8	15.59	2.186	0	0	3758	668.1	275.5	1009	762.1	334.2	1003	6076	233.9	1044	25.66	1051	299.4	898.3
3StdDev	237	311.3	46.77	6.557	0	0	11274	2004	826.6	3026	2286	1003	3008	18229	701.8	3133	76.97	3152	898.3	2695
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Radius	Diameter	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integration	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
1	234.8	234.8	121.3	39.03	6.212	12.43	40845	1857	3443	0	3443	1160	3480	13355	607	2232	72	2160	626.9	1881
2	386.4	309.4	116.4	39.5			37071	2648	3725	1622	2103	559.4	1678	3032	216.6	409	107	302	95.89	287.7
3	272.1	439.8	145.5	43.03			44587	3185	3994	1850	2144	605.9	1818	2640	188.6	438	57	381	121.5	364.6

Region Measurement - Ikan Tawes I Kontrol estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	322.2	323.5	98.62	35.18	5.591	11.18	32703	2395	3608	1598	2010	527.8	1583	27156	1916	2593	1158	1435	448.6	1346
Max	443.6	374	121.3	39.03	6.212	12.43	45428	2774	3853	2084	2171	565.8	1697	42053	2088	2747	1502	1719	481.1	1443
Min	176.4	231.1	77.6	31.23	4.97	9.94	22193	2065	3456	1285	1769	491.1	1473	16706	1747	2412	944	1119	405.1	1215
Range	267.1	142.9	43.65	7.807	1.242	2.485	23235	709.2	397	799	402	74.7	224.1	25347	341.4	335	558	600	76.01	228
StdDev	135.2	80.1	21.87	3.904	0.879	1.757	11775	357.2	214	426.5	212.6	37.36	112.1	13246	170.7	169.2	300.9	301.3	39.21	117.6
3StdDev	405.7	240.3	65.61	11.71	2.636	5.271	35324	1072	642	1279	637.8	112.1	336.3	39737	512.2	507.6	902.6	904	117.6	352.9
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	346.7	231.1	97	35.26			22193	2774	3853	2084	1769	526.6	1580	16706	2088	2621	1502	1119	405.1	1215
3	176.4	365.3	77.6	31.23	4.97	9.94	30488	2345	3516	1426	2090	565.8	1697	22709	1747	2412	944	1468	481.1	1443
4	443.6	374	121.3	39.03	6.212	12.43	45428	2065	3456	1285	2171	491.1	1473	42053	1912	2747	1028	1719	459.8	1379

Region Measurement - Ikan Tawes II Kontrol estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	325.9	266.3	90.53	33.91	4.97	9.94	23680	2242	3633	483.3	3150	1001	3004	4833	432.5	1356	101.3	1255	364.1	1092
Max	401.3	392.6	97	35.26	4.97	9.94	33009	2673	4095	1262	4088	1192	3575	6472	542.5	1908	156	1872	539.5	1619
Min	223.7	182.6	77.6	31.23	4.97	9.94	16643	1513	2709	7	2528	762.3	2287	2058	257.3	654	36	542	175.7	527
Range	177.7	210	19.4	4.037	0	0	16366	1160	1386	1255	1560	429.3	1288	4414	285.3	1254	120	1330	363.8	1091
StdDev	91.85	111.3	11.2	2.326	0	0	8420	634.8	800.2	679.9	826.8	218.7	656.2	2416	153.4	640.3	60.71	670.1	182.3	546.8
3StdDev	275.5	333.9	33.6	6.978	0	0	25261	1904	2401	2040	2480	656.2	1969	7248	460.3	1921	182.1	2010	546.8	1640
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	223.7	182.6	97	35.25			16643	1513	2709	181	2528	762.3	2287	5968	542.5	1506	156	1350	377	1131
3	401.3	223.7	97	35.26			21387	2673	4095	1262	2833	1050	3149	2058	257.3	654	112	542	175.7	527
4	352.9	392.6	77.6	31.23	4.97	9.94	33009	2539	4095	7	4088	1192	3575	6472	497.8	1908	36	1872	539.5	1619

Region Measurement – Ikan Tawes III Kontrol estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	260.1	294.9	77.6	31.23	4.97	9.94	36403	2800	3702	1820	1883	591.9	1776	3172	244	575.7	78.67	497	144.1	432.2
Max	370.3	370.3	77.6	31.23	4.97	9.94	38097	2931	3881	1962	2309	677	2031	4229	325.3	1022	136	886	243.9	731.8
Min	174	213.7	77.6	31.23	4.97	9.94	34522	2656	3605	1572	1659	548.5	1645	2027	155.9	309	50	259	73.74	221.2
Range	196.3	156.6	0	0	0	0	3575	275	276	390	650	128.6	385.7	2202	169.4	713	86	627	170.2	510.5
StdDev	100.3	78.44	0	0	0	0	1795	138.1	154.9	215.3	369.4	73.74	221.2	1104	84.9	389	49.65	339.7	88.86	266.6
3StdDev	301	235.3	0	0	0	0	5384	414.2	464.8	645.8	1108	221.2	663.7	3311	254.7	1167	149	1019	266.6	799.7
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	174	213.7	77.6	31.23	4.97	9.94	36589	2815	3621	1962	1659	550.2	1651	2027	155.9	309	50	259	73.74	221.2
3	370.3	300.7	77.6	31.23	4.97	9.94	34522	2656	3605	1925	1680	548.5	1645	3260	250.8	396	50	346	114.5	343.5
4	236.1	370.3	77.6	31.23	4.97	9.94	38097	2931	3881	1572	2309	677	2031	4229	325.3	1022	136	886	243.9	731.8

Region Measurement – Ikan Tawes I Jantan Sungai Surabaya estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	379.8	334.6	84.07	32.57	4.97	9.94	30086	2730	3274	1786	1488	429.3	1288	7065	624	1098	53.33	1045	348.9	1047
Max	482.1	549.2	97	35.26	4.97	9.94	36133	3243	3693	2860	2600	693.8	2081	11571	890.1	1555	160	1555	527.3	1582
Min	198.8	221.2	77.6	31.23	4.97	9.94	25941	2168	2867	267	833	278	834.1	4602	354	791	0	788	241.7	725
Range	283.3	328	19.4	4.037	0	0	10192	1075	826	2593	1767	415.8	1247	6969	536.1	764	160	767	285.6	856.8
StdDev	157.2	185.9	11.2	2.331	0	0	5355	539	413.1	1353	968.1	229.9	689.6	3908	268.1	403.5	92.38	442	155.5	466.4
3StdDev	471.6	557.7	33.6	6.992	0	0	16066	1617	1239	4058	2904	689.6	2069	11723	804.2	1210	277.1	1326	466.4	1399
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	198.8	233.6	77.6	31.23	4.97	9.94	36133	2779	3262	2231	1031	316	948.1	4602	354	791	0	791	277.9	833.7
3	482.1	221.2	77.6	31.23	4.97	9.94	28185	2168	2867	267	2600	693.8	2081	11571	890.1	1555	0	1555	527.3	1582
4	458.5	549.2	97	35.26			25941	3243	3693	2860	833	278	834.1	5023	627.9	948	160	788	241.7	725

Region Measurement - Ikan Tawes II Jantan Sungai Surabaya estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	333	224.1	84.07	32.57	4.97	9.94	21620	1755	2490	1073	1416	416.7	1250	12786	1031	1590	493.3	1097	372.2	1117
Max	591.4	355.4	97	35.25	4.97	9.94	23273	1795	2557	1405	1650	513.2	1540	14691	1130	1664	505	1177	399.5	1199
Min	109.3	17.4	77.6	31.23	4.97	9.94	19743	1680	2414	848	1152	329.2	987.7	10208	928	1457	472	954	318.3	954.8
Range	482.1	338	19.4	4.021	0	0	3530	114.4	143	557	498	184	552	4483	202.1	207	33	223	81.23	243.7
StdDev	242.9	181.2	11.2	2.322	0	0	1776	64.79	71.86	293.3	250.4	92.34	277	2316	101.1	115.4	18.5	123.9	46.7	140.1
3StdDev	728.8	543.5	33.6	6.965	0	0	5327	194.4	215.6	880	751.2	277	831.1	6948	303.3	346.3	55.51	371.6	140.1	420.3
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	109.3	355.4	77.6	31.23	4.97	9.94	23273	1790	2498	848	1650	513.2	1540	14691	1130	1664	505	1159	399.5	1199
3	591.4	299.4	97	35.25			19743	1795	2557	1405	1152	329.2	987.7	10208	928	1649	472	1177	398.8	1197
4	298.2	17.4	77.6	31.23	4.97	9.94	21845	1680	2414	967	1447	407.6	1223	13459	1035	1457	503	954	318.3	954.8

Region Measurement - Ikan Tawes III Jantan Sungai Surabaya estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	357	321.8	111.6	37.93	6.212	12.43	31143	2027	3397	1041	2356	731.8	2195	18574	1157	1800	597	1203	373.9	1122
Max	508.2	451	121.3	39.5	6.212	12.43	42156	2347	3973	1399	3031	1005	3015	26929	1359	2104	925	1629	503.9	1512
Min	263.4	175.2	97	35.25	6.212	12.43	25459	1819	2849	783	1450	321.9	965.7	9766	887.8	1440	391	932	269.1	807.4
Range	244.8	275.8	24.25	4.252	0	0	16697	528.3	1124	616	1581	683.1	2049	17163	471.2	664	534	697	234.7	704.2
StdDev	132.2	138.7	12.83	2.332	0	0	9539	281.1	562.5	319.8	815.4	361.5	1084	8590	242.7	335.6	287.1	373.3	119.4	358.2
3StdDev	396.5	416.2	38.5	6.996	0	0	28617	843.3	1687	959.4	2446	1084	3253	25771	728	1007	861.4	1120	358.2	1074
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	299.4	339.2	121.3	39.03	6.212	12.43	42156	1916	2849	1399	1450	321.9	965.7	26929	1224	2104	475	1629	503.9	1512
3	508.2	175.2	116.4	39.5			25459	1819	3370	783	2587	868.6	2606	19026	1359	1857	925	932	269.1	807.4
4	263.4	451	97	35.25			25815	2347	3973	942	3031	1005	3015	9766	887.8	1440	391	1049	348.6	1046

Region Measurement - Ikan Tawes I Jantan Sungai Kalimas estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	320.2	286.2	90.53	33.91	18684	1773	2439	1106	1334	407.6	1223	15192	1435	2128	882	1246	397.7	1193
Max	462.2	480.8	97	35.26	21889	1941	2849	1150	1734	522.1	1566	17533	1490	2199	965	1348	439.9	1320
Min	212.5	176.4	77.6	31.23	15527	1684	2135	1052	985	313.4	940.2	11920	1349	2022	814	1057	353.3	1060
Range	249.7	304.4	19.4	4.037	6362	257.1	714	98	749	208.7	626.2	5613	141.3	177	151	291	86.57	259.7
StdDev	128.4	169	11.2	2.326	3181	145.6	368.5	49.66	377.2	105.8	317.5	2920	75.58	93.36	76.61	163.6	43.33	130
3StdDev	385.1	507.1	33.6	6.978	9544	436.7	1105	149	1131	317.5	952.6	8761	226.7	280.1	229.8	490.8	130	390
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	462.2	201.3	77.6	31.23	21889	1684	2135	1150	985	313.4	940.2	17533	1349	2162	814	1348	400	1200
3	285.8	480.8	97	35.25	18635	1694	2334	1052	1282	387.3	1162	16124	1466	2199	867	1332	439.9	1320
4	212.5	176.4	97	35.26	15527	1941	2849	1115	1734	522.1	1566	11920	1490	2022	965	1057	353.3	1060

Region Measurement - Ikan Tawes II Jantan Sungai Kalimas estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	292.4	350.8	109.9	38.15	18534	1532	2222	727.3	1494	548	1644	30538	2356	2801	1910	891	257	771.1
Max	467.2	470.9	135.8	43.96	23489	2135	3003	1186	1817	733.4	2200	39334	2451	3021	2020	1297	361.4	1084
Min	24.85	274.6	97	35.25	14331	843	1193	242	951	284	852.1	25324	2302	2566	1724	579	165.2	495.7
Range	442.3	196.3	38.8	8.711	9158	1292	1810	944	866	449.4	1348	14010	148.5	455	296	718	196.2	588.6
StdDev	235.3	105.3	22.4	5.029	4625	650.4	930	472.6	473.3	234.7	704.2	7661	82.57	227.9	162.2	368.1	98.7	296.1
3StdDev	705.9	315.8	67.2	15.09	13875	1951	2790	1418	1420	704.2	2113	22983	247.7	683.7	486.6	1104	296.1	888.3
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	385.2	306.9	97	35.25	23489	2135	3003	1186	1817	733.4	2200	26957	2451	2817	2020	797	244.5	733.5
3	467.2	470.9	97	35.25	17782	1617	2469	754	1715	626.4	1879	25324	2302	2566	1987	579	165.2	495.7
4	24.85	274.6	135.8	43.96	14331	843	1193	242	951	284	852.1	39334	2314	3021	1724	1297	361.4	1084

Region Measurement - Ikan Tawes III Jantan Sungai Kalimas estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	438.2	235.2	90.53	33.92	4.97	9.94	8075	850.9	1199	538.3	660.3	238.3	714.8	22128	2355	2747	2052	694.3	245.7	737
Max	550.4	387.7	97	35.26	4.97	9.94	9889	1073	1567	654	913	371.2	1114	25640	2637	2936	2295	936	306	918
Min	299.4	59.64	77.6	31.23	4.97	9.94	5752	719	1005	421	484	137.2	411.7	19649	1972	2608	1672	506	173.6	520.8
Range	251	328	19.4	4.037	0	0	4137	353.9	562	233	429	234	702	5991	664.7	328	623	430	132.4	397.2
StdDev	127.6	165.2	11.2	2.331	0	0	2115	193.4	319.1	116.5	224.5	120.2	360.7	3126	343.7	169.8	333.5	219.9	66.98	200.9
3StdDev	382.7	495.7	33.6	6.992	0	0	6344	580.2	957.4	349.5	673.4	360.7	1082	9378	1031	509.3	1001	659.7	200.9	602.8
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	550.4	258.4	97	35.26			5752	719	1005	421	584	206.3	618.9	21096	2637	2936	2295	641	257.4	772.2
3	464.7	59.64	77.6	31.23	4.97	9.94	9889	760.7	1024	540	484	137.2	411.7	25640	1972	2608	1672	936	306	918
4	299.4	387.7	97	35.26			8583	1073	1567	654	913	371.2	1114	19649	2456	2696	2190	506	173.6	520.8

Region Measurement - Ikan Tawes I Jantan Kontrol estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	263.8	407.5	84.07	32.57	4.97	9.94	7371	701	2079	115.3	1964	638.1	1914	13333	1206	1871	742.7	1128	397.4	1192
Max	320.6	536.8	97	35.26	4.97	9.94	8360	1045	2187	333	2187	671	2013	14550	1406	2166	905	1261	488.4	1465
Min	200	233.6	77.6	31.23	4.97	9.94	5503	423.3	1897	0	1820	599.1	1797	11246	1092	1653	629	1024	342.5	1028
Range	120.5	303.2	19.4	4.037	0	0	2857	621.7	290	333	367	71.92	215.8	3304	313.3	513	276	237	145.9	437.7
StdDev	60.57	156.5	11.2	2.331	0	0	1619	316.1	158.5	188.6	196	36.35	109	1815	173.7	265.2	144.3	121.1	79.39	238.2
3StdDev	181.7	469.4	33.6	6.992	0	0	4856	948.3	475.6	565.9	588.1	109	327.1	5446	521	795.5	432.9	363.4	238.2	714.5
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	200	233.6	97	35.26			8360	1045	2153	333	1820	671	2013	11246	1406	2166	905	1261	488.4	1465
3	270.9	452.3	77.6	31.23	4.97	9.94	8250	634.6	1897	13	1884	644.2	1933	14550	1119	1793	694	1099	361.2	1084
4	320.6	536.8	77.6	31.23	4.97	9.94	5503	423.3	2187	0	2187	599.1	1797	14202	1092	1653	629	1024	342.5	1028

Region Measurement - Ikan Tawes II Jantan Kontrol estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	493.69	301.51	77.6	31.227	4.97	9.94	5858.3	450.64	782	258.67	523.33	154.25	462.76	10478	806	1554.3	329	1225.3	374.68	1124
Max	556.64	516.88	77.6	31.227	4.97	9.94	8948	688.31	948	506	595	184.64	553.93	12638	972.15	1926	428	1654	508.31	1524.9
Min	412.51	173.95	77.6	31.227	4.97	9.94	2926	225.08	608	75	442	125.76	377.29	7185	552.69	999	272	571	152.32	456.97
Range	144.13	342.93	0	0	0	0	6022	463.23	340	431	153	58.879	176.64	5453	419.46	927	156	1083	355.98	1067.9
StdDev	73.773	187.57	0	0	0	0	3014.1	231.85	170.14	222.44	76.957	29.485	88.456	2897.7	222.9	490.03	86.064	575.69	193.87	581.61
3StdDev	221.32	562.71	0	0	0	0	9042.2	695.56	510.42	667.33	230.87	88.456	265.37	8693.1	668.7	1470.1	258.19	1727.1	581.61	1744.8
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	556.64	173.95	77.6	31.227	4.97	9.94	8948	688.31	948	506	442	125.76	377.29	11611	893.15	1926	272	1654	463.42	1390.3
3	412.51	213.71	77.6	31.227	4.97	9.94	5701	438.54	790	195	595	184.64	553.93	12638	972.15	1738	287	1451	508.31	1524.9
4	511.91	516.88	77.6	31.227	4.97	9.94	2926	225.08	608	75	533	152.35	457.05	7185	552.69	999	428	571	152.32	456.97

Region Measurement - Ikan Tawes III Jantan Kontrol estradiol-Rhod 200x.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:4

	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
Count	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Average	423.28	350.8	84.067	32.568	4.97	9.94	7446.3	599.15	957.67	174.67	783	220.51	661.52	13083	1032.4	1775.7	473.67	1302	410.26	1230.8
Max	524.34	497	97	35.248	4.97	9.94	11584	891.08	1206	504	874	256.56	769.69	17149	1319.2	2214	862	1925	637.5	1912.5
Min	367.78	101.89	77.6	31.227	4.97	9.94	5103	392.54	793	0	702	194.13	582.39	5580	507.27	1280	270	971	274.13	822.39
Range	156.56	395.12	19.4	4.021	0	0	6481	498.54	413	504	172	62.433	187.3	11569	811.88	934	592	954	363.37	1090.1
StdDev	87.659	216.66	11.201	2.322	0	0	3593.8	259.99	218.84	285.39	86.435	32.324	96.971	6505.4	455.42	469.63	336.44	539.89	198.08	594.23
3StdDev	262.98	649.98	33.602	6.965	0	0	10781	779.98	656.53	856.16	259.31	96.971	290.91	19516	1366.2	1408.9	1009.3	1619.7	594.23	1782.7
ROI	CenterX [um]	CenterY [um]	Area [um^2]	Perimeter [um]	Radius [um]	Diameter [um]	Integration CH2	Average CH2	Max CH2	Min CH2	Range CH2	StdDev CH2	3StdDev CH2	Integration TD1	Average TD1	Max TD1	Min TD1	Range TD1	StdDev TD1	3StdDev TD1
2	377.72	497	77.6	31.227	4.97	9.94	11584	891.08	1206	504	702	194.13	582.39	16520	1270.8	2214	289	1925	637.5	1912.5
3	524.34	453.51	97	35.248			5652	513.82	874	0	874	256.56	769.69	5580	507.27	1280	270	1010	274.13	822.39
4	367.78	101.89	77.6	31.227	4.97	9.94	5103	392.54	793	20	773	210.82	632.46	17149	1319.2	1833	862	971	319.15	957.44

Lampiran 5. Analisa Uji BNT

a.) Uji BNT rata-rata intensitas gonad ikan Tawes (*Puntius javanicus*) betina

Ulangan	Perlakuan			Total
	S.Surabaya	S.Kalimas	Kontrol	
1	3523,78	2738,81	2394,75	
2	3319,63	3150,27	2241,84	
3	3166,82	2563,09	2800,20	
Total	10010,23	8452,17	7436,79	25899,19
Rata-rata	3336,74	2817,39	2478,93	

$$JKT = 3523,78^2 + 2738,81^2 + 2394,75^2 + \dots + 2800,20^2 - \frac{25899,19^2}{3 \times 3}$$

$$= 1532441,04$$

$$JKP = \frac{10010,23^2}{3} + \frac{8452,17^2}{3} + \frac{7436,79^2}{3} - \frac{25899,19^2}{3 \times 3}$$

$$= 1120126,77$$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 1532441,04 - 1120126,77$$

$$= 412314,27$$

$$KTP = \frac{JKP}{t-1} = \frac{1120126,77}{3-1} = 560063,39$$

$$KTG = \frac{JKG}{t(n-1)} = \frac{412314,27}{3(3-1)} = 68719,05$$

$$F \text{ hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{560063,39}{68719,05} = 8,15$$

Sumber Keragaman (s.k)	Derajat bebas (d.b)	Jumlah kuadrat (J.K)	Kuadrat Tengah (K.T)	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	1120126,77	560063,39	8,15*	5,14	10,92
Galat	6	412314,27	68719,05			
Total	8	1532441,04				

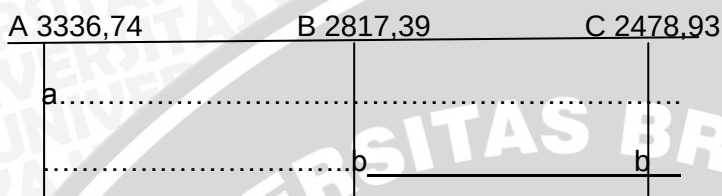
Uji BNT

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t(5\%) (6) \times \frac{\sqrt{2 \text{ KTG}}}{n} \\ &= 2,447 \times \frac{\sqrt{2 \times 68719,05}}{3} \\ &= 2,447 \times \sqrt{45812,7} \\ &= 2,447 \times 214,04 \\ &= 523,75 \end{aligned}$$

Selisih rata-rata perlakuan

Perlakuan	Rata-rata perlakuan (x)	Beda (selisih)		BNT (5%)
		($\bar{x}-C$)	($\bar{x}-B$)	
A	3336,74 (a)	857,81*	519,35	523,75
B	2817,39 (b)	338,46		
C	2478,93 (b)			

Keterangan : A = Sungai Surabaya
B = Sungai Kalimas
C = Kontrol



Kesimpulan :

Dari hasil analisa statistik diketahui bahwa, intensitas rata-rata ekspresi hormon 17- β estradiol dengan diameter 10 μ di sungai Surabaya (A) berbeda nyata dengan ikan kontrol (C), sedangkan di sungai Kalimas Surabaya (B) dianggap tidak berbeda nyata dengan ikan kontrol (C) sehingga dapat dikatakan ikan di sungai Surabaya mempunyai rata-rata intensitas hormon 17- β estradiol yang tinggi.

b.) Uji BNT rata-rata intensitas gonad ikan Tawes (*Puntius javanicus*) jantan

Ulangan	Perlakuan			Total
	S.Surabaya	S.Kalimas	Kontrol	
1	2730,05	1772,91	700,97	
2	1755,14	1531,63	450,64	
3	2017,16	2542,05	599,14	
Total	6512,35	5846,59	1750,75	14109,69
Rata-rata	2170,78	1948,86	583,58	

$$JKT = 2730,05^2 + 1772,91^2 + 700,97^2 + \dots + 583,58^2 - \frac{14109,69^2}{3 \times 3}$$

$$= 5527217,28$$

$$JKP = \frac{6512,35^2}{3} + \frac{5846,59^2}{3} + \frac{1750,75^2}{3} - \frac{14109,69^2}{3 \times 3}$$

$$= 4432441,81$$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 5527217,28 - 4432441,81$$

$$= 1094775,47$$

$$KTP = \frac{JKP}{t-1} = \frac{4432441,81}{3-1} = 2216220,9$$

$$KTG = \frac{JKG}{t(n-1)} = \frac{1094775,47}{3(3-1)} = 182462,58$$

$$F \text{ hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{2216220,9}{182462,58} = 12,14$$

Sumber Keragaman (s.k)	Derajat bebas (d.b)	Jumlah kuadrat (J.K)	Kuadrat Tengah (K.T)	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	4432441,81	2216220,9	12,14**	5,14	10,92
Galat	6	1094775,47	182462,58			
Total	8					

F hitung lebih besar dari F tabel (Data berbeda nyata)

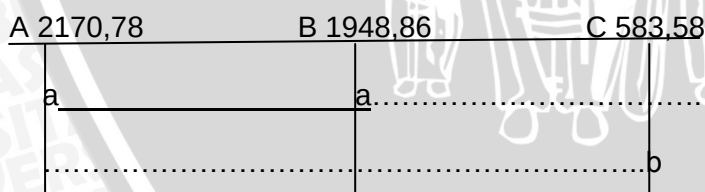
Uji BNT

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t(5\%) (6) \times \frac{\sqrt{2 KTG}}{n} \\ &= 2,447 \times \frac{\sqrt{2 \times 182462,58}}{3} \\ &= 2,447 \times \sqrt{121641,72} \\ &= 2,447 \times 348,77 \\ &= 853,44 \end{aligned}$$

Selisih rata-rata perlakuan

Perlakuan	Rata-rata perlakuan (x)	Beda (selisih)		BNT (5%)
		(x-C)	(x-B)	
A	2170,78 (a)	1587,2*	221,92	853,44
B	1948,86 (a)	1365,28*		
C	583,58 (b)			

Keterangan : A = Sungai Surabaya
B = Sungai Kalimas
C = Kontrol



Kesimpulan :

Dari hasil analisa statistik diketahui bahwa, intensitas rata-rata ekspresi hormon 17-β estradiol dengan diameter 10μ di sungai Surabaya (A) berbeda nyata dengan ikan kontrol (C), di sungai Kalimas Surabaya (B) juga berbeda nyata dengan ikan kontrol (C), sehingga dapat dikatakan ikan di sungai Surabaya dan di Kalimas Surabaya mempunyai rata-rata intensitas hormon 17-β estradiol yang tinggi.



PRESIDEN
REPUBLIK INDONESIA

LAMPIRAN
PERATURAN PEMERINTAH
NOMOR 82 TAHUN 2001
TANGGAL 14 Desember 2001
TENTANG PENGELOLAAN KUALITAS AIR DAN
PENGENDALIAN PENCEMARAN AIR

Lampiran 6. PP No.82 Tahun 2001

Kriteria Mutu Air Berdasarkan Kelas

PARAMETER	SATUAN	KELAS				Keterangan
		I	II	III	IV	
FISIKA						
Temperatur	°C	deviasi 3	deviasi 3	deviasi 3	deviasi 5	Deviasi temperatur dari keadaan alamiahnya
Residu Terlarut	mg/L	1000	1000	1000	2000	
Residu Tersuspensi	mg/L	50	50	400	400	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, residu tersuspensi ≤ 5000 mg/L
KIMIA ANORGANIK						
pH		6 - 9	6 - 9	6 - 9	5 - 9	Apabila secara alamiah di luar rentang tersebut, maka ditentukan berdasarkan kondisi alamiah
BOD	mg/L	2	3	6	12	
COD	mg/L	10	25	50	100	
DO	mg/L	6	4	3	0	Angka batas minimum
Total fosfat sbg P	mg/L	0,2	0,2	1	5	
NO ₃ sebagai N	mg/L	10	10	20	20	
NH ₄ ⁺ -N	mg/L	0,5	(-)	(-)	(-)	Bagi Perikanan, kandungan amonia bebas untuk ikan yang peka ≤ 0,02 mg/L sebagai NH ₃
Arsen	mg/L	0,05	1	1	1	
Kobalt	mg/L	0,2	0,2	0,2	0,2	
Barium	mg/L	1	(-)	(-)	(-)	
Boron	mg/L	1	1	1	1	
Selenium	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,05	
Kadmium	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	
Krom (VI)	mg/L	0,05	0,05	0,05	1	
Tembaga	mg/L	0,02	0,02	0,02	0,2	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, Cu ≤ 1 mg/L
Besi	mg/L	0,3	(-)	(-)	(-)	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, Fe ≤ 5 mg/L
Timbal	mg/L	0,03	0,03	0,03	1	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, Pb < 0,1 mg/L

Mangan ...



PRESIDEN
REPUBLIK INDONESIA

- 2 -

PARAMETER	SATUAN	KELAS				Keterangan
		I	II	III	IV	
FISIKA						
Mangan	mg/L	0.1	(-)	(-)	(-)	
Air Raksa	mg/L	0.001	0.002	0.002	0.005	
Seng	mg/L	0.05	0.05	0.05	2	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, Zn ≤ 5 mg/L
Klorida	mg/L	600	(-)	(-)	(-)	
Sianida	mg/L	0.02	0.02	0.02	(-)	
Fluorida	mg/L	0.5	1.5	1.5	(-)	
Nitrit sebagai N	mg/L	0.06	0.06	0.06	(-)	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, NO ₂ -N ≤ 1 mg/L
Sulfat	mg/L	400	(-)	(-)	(-)	
Klorin bebas	mg/L	0.03	0.03	0.03	(-)	Bagi ABAM tidak dipersyaratkan
Belarang sebagai H ₂ S	mg/L	0.002	0.002	0.002	(-)	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, S sebagai H ₂ S < 0.1 mg/L
MIKROBIOLOGI						
- Faecal coliform	Jml/100 ml	100	1000	2000	2000	Bagi pengolahan air minum secara konvensional, fecal coliform ≤ 2000 jml/100 mL dan Total coliform ≤ 10000 jml/100 mL
- Total coliform	Jml/100 ml	1000	5000	10000	10000	
RADIOAKTIVITAS						
- Gross- A	Bq/L	0.1	0.1	0.1	0.1	
- Gross- B	Bq/L	1	1	1	1	
KIMIA ORGANIK						
Minyak dan Lemak	ug/L	1000	1000	1000	(-)	
Detergen sebagai MBAS	ug/L	200	200	200	(-)	
Senyawa Fenol sebagai fenol	ug/L	1	1	1	(-)	
BHC	ug/L	210	210	210	(-)	
Aldrin /Dieldrin	ug/L	17	(-)	(-)	(-)	
Chlordane	ug/L	3	(-)	(-)	(-)	
DDT	ug/L	2	2	2	2	

Heptachlor ...



PRESIDEN
REPUBLIK INDONESIA

- 3 -

PARAMETER FISIKA	SATUAN	KELAS				Keterangan
		I	II	III	IV	
Heptachlor dan heptachlor epoxide	ug/L	18	(-)	(-)	(-)	
Lindane	ug/L	56	(-)	(-)	(-)	
Methoxychlor	ug/L	35	(-)	(-)	(-)	
Endrin	ug/L	1	4	4	(-)	
Toxaphen	ug/L	5	(-)	(-)	(-)	

Keterangan:

mg = milligram

ug = mikrogram

ml = milliliter

L = Liter

Bq = Becquerel

MBAS = Methylene Blue Active Substance

ABAM = Air Baku untuk Air Minum

Logam berat merupakan logam terlarut

Nilai di atas merupakan batas maksimum, kecuali untuk pH dan DO.

Bagi pH merupakan nilai rentang yang tidak boleh kurang atau lebih dari nilai yang tercantum.

Nilai DO merupakan batas minimum.

Arti (-) di atas menyatakan bahwa untuk kelas maksimum, parameter tersebut tidak dipersyaratkan

Tanda < adalah lebih kecil atau sama dengan

Tanda > adalah lebih kecil

PRESIDEN REPUBLIK INDONESIA

tttd

MEGAWATI SOEKARNOPUTRI

Salinan sesuai dengan aslinya

Deputi Sekretaris Kabinet

Bidang Hukum dan Perundang-undangan,

Lambeck V. Nahattands

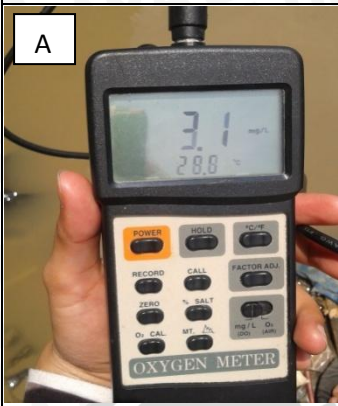
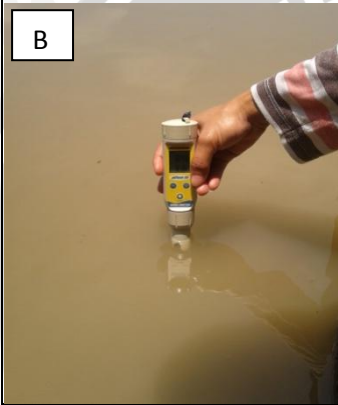
Lampiran 7. Foto Pengambilan Sampel Ikan Tawes (*PuntiusJavanicus*)

Foto	Keterangan:
A 	A: Foto pengambilan sampel ikan tawes di Sungai Surabaya yang berada di dekat jembatan jalan raya.
B 	B: Foto pengambilan sampel ikan tawes di Sungai Kalimas Surabaya yang berada di dekat jembatan dan pintu air.
C 	C: Lokasi pengambilan sampel ikan tawes kontrol di Balai Umbulan, Pasuruan.

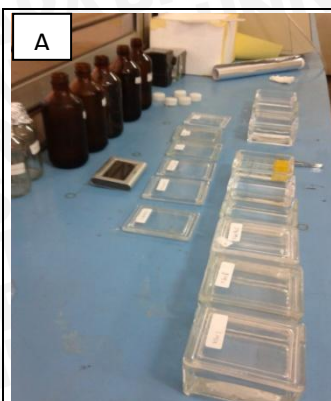
Lampiran 8. Foto Ikan Tawes (*Puntius javanicus*)

Foto	Keterangan:
A  (Doc.pribadi)	A: Gambar ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>)
B  (Doc.pribadi)	B: Penimbangan berat tubuh ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>)
C  (Doc.pribadi)	C: Pengambilan gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) betina saat dibedah dengan menggunakan section set.
D  (Doc.pribadi)	D: Penimbangan gonad ikan tawes (<i>Puntius javanicus</i>) jantan dengan menggunakan timbangan digital.

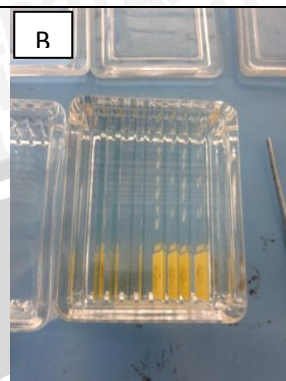
Lampiran 9. Foto Pengukuran Kualitas Air

Foto	Keterangan:
A  (Doc.pribadi)	A: Pengukuran kualitas air dengan DO meter untuk parameter DO dan Suhu di sungai Surabaya.
B  (Doc.pribadi)	B: Pengukuran kualitas air dengan pH meter untuk mengukur pH di sungai Surabaya.
C  (Doc.pribadi)	C: Pengukuran TOM di laboratorium IIP (Ilmu-IlmuPerairan) FPIK-UB.
D  (Doc.pribadi)	D: Bahan yang digunakan untuk mengukur TOM (Total Organic Mater).

Lampiran 10. Foto Pewarnaan Preparat Gonad Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) untuk Imunohistokimia



A: Persiapan alat dan bahan untuk pewarnaan preparat di LSIH-UB.



(doc.pribadi)

B: Deparafinasi preparat dalam jar



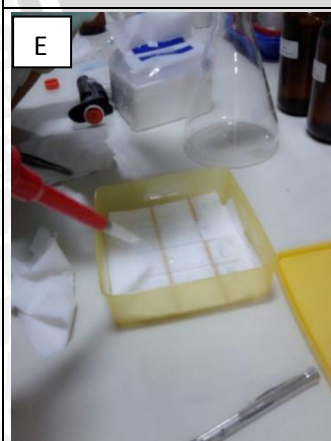
(doc.pribadi)

C: Pencucian preparat dalam PBS



(doc.pribadi)

D: Pencucian preparat setelah diberi antibody primer dalam jar gelap



(doc.pribadi)

E: Pewarnaan antibody



(doc.pribadi)

F: Perangkat Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) di laboratorium Molekuler dan seluler LSIH-UB.