

ANALISIS EKSPRESI *ESTROGEN RECEPTOR* (ER) PADA GONAD KERANG HIJAU (*Perna viridis*) DARI PERAIRAN NGEMBOH GRESIK, PERAIRAN KALIGUNG PASURUAN DAN PERAIRAN NGULING PASURUAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY* (CLSM)

SKRIPSI

Oleh:

ASTRI LORMA AYUK NITA

155080101111043



**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2019**

ANALISIS EKSPRESI *ESTROGEN RECEPTOR* (ER) PADA GONAD KERANG HIJAU (*Perna viridis*) DARI PERAIRAN NGEMBOH GRESIK, PERAIRAN KALIGUNG PASURUAN DAN PERAIRAN NGULING PASURUAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY* (CLSM)

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

ASTRI LORMA AYUK NITA

155080101111043



**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2019**

LEMBAR PENGESAHAN

SKRIPSI

ANALISIS EKSPRESI *ESTROGEN RECEPTOR (ER)* PADA GONAD KERANG HIJAU (*Perna viridis*) DARI PERAIRAN NGEMBOH GRESIK, PERAIRAN KALIGUNG PASURUAN DAN PERAIRAN NGULING PASURUAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY (CLSM)*

Oleh:
ASTRI LORMA AYUK NITA
155080101111043

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 19 Juni 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,
Ketua Jurusan
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
PERIKAWAN
Dr. H. M. Firdaus, MP
NIP. 196809012005011001
Tanggal: **03 JUL 2019**



Menyetujui,
Dosen Pembimbing
Prof. Ir. Yenny Rislani, DEA, PhD
NIP. 196105231987032003
Tanggal: **03 JUL 2019**

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul: **ANALISIS EKSPRESI *ESTROGEN RECEPTOR (ER)* PADA GONAD KERANG HIJAU (*Perna viridis*) DARI PERAIRAN NGEMBOH GRESIK, PERAIRAN KALIGUNG PASURUAN DAN PERAIRAN NGULING PASURUAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY (CLSM)***

Nama Mahasiswa : ASTRI LORMA AYUK NITA
NIM : 155080101111043
Program Studi : MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

PENGUJI PEMBIMBING :
Pembimbing : Prof. Ir. YENNY RISJANI, DEA, Ph.D

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING :
Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. DIANA ARFIATI, MS
Dosen Penguji 2 : Dr. YUNI KILAWATI, S.Pi., M.Si
Tanggal Ujian : 19 JUNI 2019

Riset Ini Berjalan

Dibawah Payung Riset

Penelitian Dasar “Assessment of Feminization of Indonesian Important Species (AFIIS)”

Tahun anggaran 2018

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

Ketua:

Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D. (NIDN: 0023056109)

Mahasiswa Yang Terlibat:

1. Astri Lorma Ayuk Nita (NIM: 155080101111043)
2. Fathiya Rahma (NIM: 155080107111020)
3. Sulton Effendi Yusuf (NIM: 155080107111015)
4. Mohamad Dzacky Pradana Arifin (NIM: 155080101111025)

Yang Disponsori Oleh:

Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat

Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan

Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi

Sesuai dengan Kontrak Penelitian Nomor: 054/SP2H/LT/DRPM/IV/2018

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah berperan serta dalam membantu kelancaran hingga penulisan laporan skripsi ini dapat terselesaikan. Rasa terimakasih penulis sampaikan kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia serta kesehatan hingga lancarnya penelitian dan penulisan laporan skripsi
2. Kedua orang tua dan keluarga yang tak pernah berhenti memberikan dukungan serta doanya
3. Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah membimbing, mengajarkan dan memberikan ilmunya dalam penyusunan skripsi
4. Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS dan Dr. Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan sarannya
5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang
6. Semua pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu persatu

Semoga Allah SWT senantiasa membalas segala kebaikan yang telah diberikan oleh pihak-pihak tersebut dengan pahala dan ilmu yang bermanfaat.

Malang, 19 Juni 2019

Penulis

RINGKASAN

ASTRI LORMA AYUK NITA. Analisis Ekspresi *Estrogen Receptor* (ER) Pada Gonad Kerang Hijau (*Perna viridis*) dari Perairan Ngemboh Gresik, Perairan Kaligung Pasuruan dan Perairan Nguling Pasuruan Menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) (dibawah bimbingan **Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D.**)

Perairan Kaligung, Nguling dan Ngemboh merupakan daerah yang sangat berpotensi sumberdaya perikananannya. Selain itu banyak terdapat aktivitas masyarakat seperti kegiatan rumah tangga, industri dan pertanian. Kegiatan tersebut akan menghasilkan limbah. Limbah-limbah yang dibuang tanpa adanya pengolahan dapat mengandung senyawa estrogenik. Senyawa estrogenik salah satunya adalah *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs) dapat mengganggu sistem hormonal dan dapat mengubah proses pensinyalan dengan mengikat *estrogen receptor* (ER) sehingga menghambat respon pengekspresian. Estrogen reseptor merupakan protein pengikat DNA dan mengatur ekspresi gen seksual yang selanjutnya akan direspon oleh sel gonad. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau di perairan Ngemboh Gresik, Kaligung Pasuruan dan Nguling Pasuruan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2018–Mei 2019. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode diskriptif dengan menggambarkan keadaan lokasi penelitian dengan pembuktian dari hasil data ER yang diperoleh. Pengambilan sampel kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di perairan Kaligung Pasuruan, Nguling Pasuruan dan Ngemboh Gresik. Masing-masing lokasi diambil 6 sampel kerang hijau (*Perna viridis*) yaitu 3 ekor jantan dan 3 ekor betina. Sampel kerang hijau tersebut diambil gonadnya dan dimasukkan ke dalam botol film dan diberi formalin 10%. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya dengan penambahan antibodi terlabel. Pengamatan sampel dilakukan dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM). Parameter kualitas air pendukung yang diamati adalah suhu, pH, DO dan salinitas. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil ekspresi ER pada gonad kerang hijau jantan diperairan Kaligung dan Ngemboh lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresi ER pada perairan Nguling yaitu 186,41 intensity/ μm dan 162,85 intensity/ μm . Kisaran ekspresi ER pada kerang hijau jantan diperairan Nguling yaitu 80,52 intensity/ μm - 130,45 intensity/ μm . Ekspresi ER pada gonad kerang hijau betina diperairan Kaligung lebih rendah dibandingkan perairan Nguling yaitu sebesar 199,83 intensity/ μm dan ekspresi ER pada gonad kerang hijau betina diperairan Ngemboh lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekspresi ER pada perairan Nguling yaitu sebesar 303,44 intensity/ μm . Kisaran ekspresi ER pada kerang hijau betina diperairan Nguling yaitu 226,91 intensity/ μm - 302,62 intensity/ μm . Sehingga dapat dikatakan terjadi ke abnormalan pada gonad kerang hijau jantan di perairan Kaligung Pasuruan, gonad kerang hijau betina di perairan Kaligung dan gonad kerang hijau betina di Ngemboh. Analisa data secara statistik dilakukan dengan ANOVA *one way* dan menunjukkan hasil tidak adanya perbedaan nyata ekspresi ER pada gonad kerang hijau jantan dan betina di perairan Kaligung, Nguling dan Ngemboh. Pada gonad jantan diperoleh hasil ($\text{sig.} > 0,05$) yaitu ($0,26 > 0,05$) dan pada betina diperoleh hasil ($0,33 > 0,05$) sehingga varian tidak berbeda secara nyata. Hasil pengukuran kualitas air pada perairan Kaligung, Nguling dan Ngemboh masih dalam kondisi yang baik.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul **“Analisis Ekspresi *Estrogen Receptor (ER)* Pada Gonad Kerang Hijau (*Perna Viridis*) Dari Perairan Kaligung Pasuruan, Perairan Nguling Pasuruan dan Perairan Ngemboh Gresik Menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*”**. Tujuan dibuatnya Laporan Skripsi ini adalah sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis sangat menyadari bahwa Laporan Skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, 5 April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

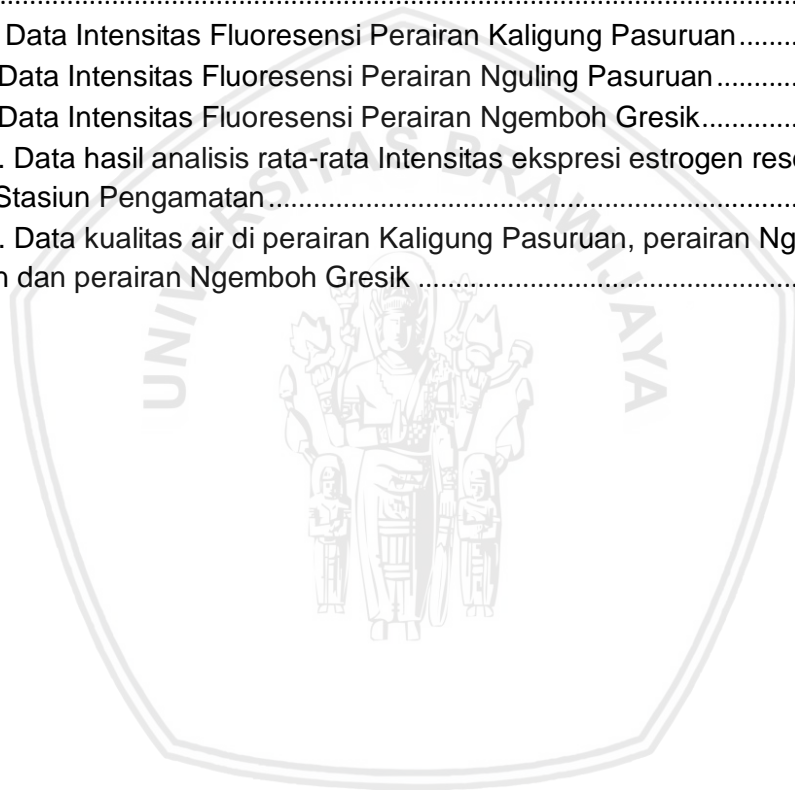
LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
UCAPAN TERIMAKASIH	v
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	5
1.4 Kegunaan	5
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Biologi Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	7
2.1.1 Klasifikasi Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	7
2.1.2 Morfologi dan Habitat Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	8
2.1.3 Kebiasaan Makan Kerang Hijau	9
2.1.4 Siklus Reproduksi	9
2.1.5 Tingkat Kematangan Gonad	11
2.2 Sistem Endokrin	12
2.2.1 Hormon	12
2.2.2 Hormon Estrogen	13
2.2.3 <i>Estrogen Receptor</i> (ER)	13
2.3 Senyawa Estrogenik dan <i>Endocrine Disrupting Chemicals</i> (EDCs)	14
2.4 Mekanisme Pencemaran Terhadap <i>Estrogen Receptor</i> (ER)	15
2.5 <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM)	17
2.6 Kelebihan dan Kelemahan <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM)	18
2.7 Pengukuran Kualitas Air	19
2.8 Penelitian Terdahulu	21
3. MATERI DAN METODE	24
3.1 Materi Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan	24
3.3 Metode Penelitian	24
3.4 Teknik Pengambilan Data	25
3.4.1 Data Primer	25
3.4.2 Data Skunder	26



3.5 Lokasi Penelitian	26
3.6 Prosedur Penelitian	27
3.6.1 Pengambilan Sampel Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	27
3.6.2 Pengamatan Tingkat Kematangan Gonad Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	28
3.6.3 Preparasi Histologi.....	28
3.6.4 Imunohistokimia	30
3.6.5 Teknik Pencitraan dengan <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM)	31
3.7 Parameter Kualitas Air Pendukung	32
3.7.1 Parameter Fisika	32
3.7.2 Parameter Kimia.....	33
3.8 Analisa Data	34
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Keadaan Umum Lokasi Penelitian	35
4.1.1 Perairan Kaligung Pasuruan.....	35
4.1.2 Perairan Nguling Pasuruan.....	36
4.1.3 Perairan Ngemboh Gresik	38
4.2. Morfologi Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>) dan Tingkat Kematangan Gonad (TKG).....	40
4.2.1. Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>) Perairan Kaligung Pasuruan.....	40
4.2.2. Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>) Perairan Nguling pasuruan	41
4.2.3. Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>) Perairan Ngemboh Gresik	42
4.3. Ekspresi <i>Estrogen Receptor</i> (ER) pada Gonad Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	45
4.4 Data Intensitas Fluoresensi	47
4.4.1 Perbandingan Ekspresi Estrogen Reseptor Pada Ketiga Lokasi ..	51
4.5 Hasil Pengukuran Kualitas Air Pendukung.....	54
4.5.1 Parameter Fisika	55
4.5.2 Parameter Kimia.....	56
5. KESIMPULAN DAN SARAN	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	69

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Penelitian Terdahulu Mengenai Estrogen Receptor (ER) Pada Moluska	21
Tabel 2. Deskripsi morfologi tingkat kematangan gonad (TKG) kerang hijau.....	28
Tabel 3. Tingkat kematangan gonad secara morfologi di perairan Kaligung:	41
Tabel 4. Tingkat kematangan gonad secara morfologi di perairan Nguling.....	42
Tabel 5. Tingkat Kematangan Gonad Secara Morfologi di Perairan Ngemboh: .	42
Tabel 6. Morfologi dan Tingkat Kematangan Gonad Kerang Hijau Seluruh Stasiun	43
Tabel 7. Data Intensitas Fluoresensi Perairan Kaligung Pasuruan	47
Tabel 8. Data Intensitas Fluoresensi Perairan Nguling Pasuruan	48
Tabel 9. Data Intensitas Fluoresensi Perairan Ngemboh Gresik.....	49
Tabel 10. Data hasil analisis rata-rata Intensitas ekspresi estrogen reseptor Seluruh Stasiun Pengamatan	51
Tabel 11. Data kualitas air di perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik	54



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Bagan perumusan masalah	4
Gambar 2. Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	8
Gambar 3. Perkembangan Sel Telur Kerang Hijau Setelah Dibuahi Hingga Selesai Metamorfosa	11
Gambar 4. Pensinyalan Reseptor Hormon.....	17
Gambar 5. Stasiun 1: Perairan Kaligung Pasuruan.....	36
Gambar 6. Stasiun 2: perairan Nguling Pasuruan	38
Gambar 7. Stasiun 3: Perairan Ngemboh Gresik	39
Gambar 14. Rata-rata intensitas ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) jantan.....	53
Gambar 15. Rata-rata intensitas ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) betina.....	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Peta Lokasi Penelitian	69
Lampiran 2. Alat dan Bahan	70
Lampiran 3. Data <i>Region Measurement</i> Estrogen Reseptor Gonad Kerang Hijau (<i>Perna Viridis</i>)	72
Lampiran 4. Gambar Intensitas Ekspresi Estrogen Reseptor	91
Lampiran 5. Data Hasil Analisa ANOVA <i>One –Way</i> menggunakan SPSS 16.0 ..	97
Lampiran 6. Data Hasil Perhitungan ANOVA Seca Manual	101
Lampiran 7. Log Book Kegiatan Penelitian.....	104



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pasuruan dan Gresik merupakan kabupaten di Jawa Timur yang terletak di wilayah pantai pulau Jawa. Kedua kabupaten tersebut merupakan daerah yang sangat berpotensi sumberdaya perikananannya. Selain itu terdapat berbagai kegiatan masyarakat yang berlangsung. Aktivitas masyarakat yang banyak dilakukan di kabupaten Pasuruan seperti penggunaan lokasi sebagai Tempat Pelelangan Ikan (TPI), Tempat Pembuangan Akhir (TPA), Pembangkit Listrik Tenaga Uap (PLTU), pelabuhan, kegiatan tangkap ikan, kegiatan pertanian, pertambakan dan industri. Herdiansa dan Suprihardjo (2014) menyatakan bahwa kabupaten Gresik merupakan kota industri. Hal ini dikarenakan perkembangan aktivitas industri di kabupaten Gresik sangat pesat. Kawasan industri yang ada digresik diantaranya adalah industri bidang semen, industri pengolahan kayu, industri pupuk, industri cat, industri tekstil, industri peleburan baja, *docking* kapal dan pembangkit listrik. Selain kegiatan industri di kabupaten Gresik juga terdapat pelabuhan yang aktivitasnya cukup padat untuk kegiatan transportasi seperti angkut barang dan sebagainya.

Perkembangan sektor industri memberikan dampak positif dan dampak negatif. Dampak positifnya berupa perluasan lapangan pekerjaan dan peningkatan pendapatan penduduk. Sedangkan dampak negatifnya adalah perubahan penggunaan lahan yang tidak sesuai dengan kaidah, pertumbuhan penduduk yang tinggi dan pencemaran perairan akibat pembuangan air limbah. Pembuangan limbah ke perairan tanpa proses pengolahan dapat mengakibatkan tercemarnya badan air. Limbah yang dibuang tanpa pengolahan terlebih dahulu dapat mengandung senyawa estrogenik (Setiawan, 2013).

Senyawa estrogenik dapat mengganggu produksi hormon, menurunkan kualitas dan kuantitas sperma, menyebabkan terjadinya feminisasi, menyebabkan ovarium tumbuh secara abnormal (Cody, 2001) dan mengganggu homeostatis imun (Milla *et al.*, 2011). Senyawa estrogenik dapat berkaitan dengan *Estrogen Reseptor* (ER) pada membran inti sel organisme. Senyawa ini banyak dijumpai di lingkungan sehingga sering disebut juga sebagai estrogen lingkungan atau *xenoestrogen*. Senyawa estrogenik dapat dibedakan menjadi senyawa estrogenik buatan dan alami. Senyawa estrogenik buatan masuk ke dalam perairan berasal dari berbagai sumber seperti kegiatan pertanian (DDT, endrin, deildrin) dan kegiatan industri (bahan penyusun plastik dan detergen, dioksin). Sedangkan senyawa estrogen alami adalah senyawa yang dihasilkan oleh organisme misalnya senyawa dari jamur, tumbuhan, hasil ekskresi manusia maupun hewan yaitu feses dan urin (Schung *et al.*, 2011).

Salah satu organisme akuatik yang dapat digunakan sebagai biomarker pada perairan Ngemboh Gresik, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Kaligung Pasuruan adalah kerang hijau. Hal ini dikarenakan keberadaan kerang hijau di daerah tersebut cukup melimpah. Yaqin *et al.* (2015) menyatakan bahwa kerang hijau (*Perna viridis*) merupakan organisme perairan laut yang hidup sebagai *filter feeder* yang memfilter partikel-partikel yang ada di perairan tempat hidupnya. Selain itu kerang hijau merupakan organisme yang pergerakannya lambat atau sering dikenal sebagai *sedentary animal*, sehingga tidak memungkinkan menghindari bahan pencemar yang ada di lingkungannya. Hal tersebut dapat diartikan bahwa kerang hijau merupakan biomarker atau sebagai tolak ukur keadaan lingkungan yang baik berhubungan dengan cemaran dan kadar *estrogen Receptor* (ER).

Hormon estrogen merupakan hormon yang mempengaruhi kelenjar reproduksi. *Estrogen Reseptor* (ER) adalah salah satu anggota reseptor inti yang berfungsi sebagai perantara aksi hormon estrogen di dalam tubuh (Lubahn *et al.*, 1993). *Estrogen Reseptor* (ER) terbagi menjadi dua yaitu ER α dan ER β yang diaktifkan oleh estrogen dan hormon seksual untuk transkripsi gen target tertentu (Marin-Garcia, 2007). Pencemaran lingkungan dapat berinteraksi secara langsung dengan hormon yang biasa disebut dengan *hormone disruptors*, salah satunya adalah *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs). EDCs dapat berasal dari pestisida, logam, kosmetik dan sebagainya yang dapat menyebabkan gangguan pada produksi hormon steroid seperti hormon estrogen, androgen dan adrenal steroid (Schug *et al.*, 2011). EDCs dapat mempengaruhi proses pemberian sinyal oleh *Estrogen reseptor* (ER) yang terdapat pada sistem reproduksi organisme. Zat EDCs tidak dapat terdegradasi dengan mudah dan akan terakumulasi pada tubuh makhluk hidup melalui rantai makanan, sehingga zat EDCs sangat berbahaya meskipun dalam jumlah yang kecil (Ratnaningsih, 2016).

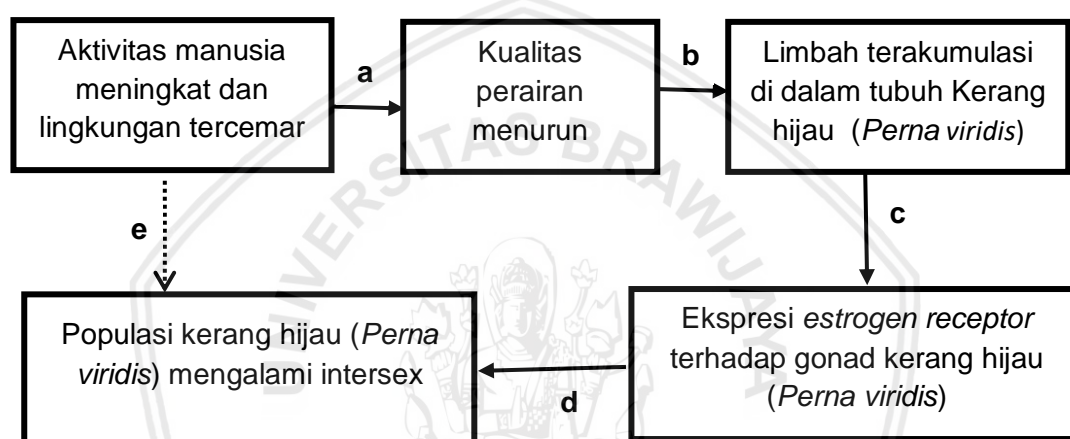
Kadar *Estrogen Reseptor* (ER) yang tinggi di dalam tubuh organisme akuatik dapat menyebabkan semakin cepatnya proses kerusakan sistem endokrin. Selain itu juga dapat terjadi ketidak seimbangan ekosistem karena penurunan populasi secara drastis sehingga rantai kehidupan organisme akuatik menjadi kacau. Sehingga perlu diadakannya penelitian untuk menguji ekspresi *Estrogen Reseptor* (ER) pada perairan ngemboh Gresik, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Kaligung Pasuruan dengan menggunakan gonad kerang hijau (*Perna viridis*) yang diduga telah terpapar senyawa estrogenik yang ada di perairan tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pengamatan lapang di sekitar perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik terdapat berbagai

kegiatan masyarakat seperti pemukiman, perindustrian, transportasi, tempat pelelangan ikan, pelabuhan dan sebagainya. Limbah yang dihasilkan dari kegiatan tersebut dapat mempengaruhi kondisi perairan dan dapat menyebabkan penurunan baku mutu perairan. Hal tersebut dapat mempengaruhi kadar estrogen receptor pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) yang hidup pada perairan tersebut. Oleh karena itu rumusan masalah pada penelitian ini dapat dilihat pada

Gambar 1.



Gambar 1. Bagan perumusan masalah

- > : berpengaruh secara langsung
-> : berpengaruh secara tidak langsung

Keterangan:

- a. Aktivitas manusia disekitar perairan Kaligung Pasuruan, Nguling Pasuruan dan Ngemboh Gresik seperti kegiatan perikanan, perkapalan, industri, pemukiman dan pertanian terus meningkat dan akan menghasilkan limbah yang dapat mengakibatkan menurunnya kualitas perairan.
- b. Bahan pencemar yang masuk kedalam perairan mampu mempengaruhi kualitas perairan dan apabila bahan pencemar tersebut melebihi ambang batas maka daya dukung lingkungan akan menurun. Sehingga dapat

- membahayakan organisme yang ada diperairan. Bahan pencemar akan terakumulasi di dalam tubuh kerang hijau (*Perna viridis*).
- c. Terakumulasinya bahan pencemar di dalam tubuh kerang hijau (*Perna viridis*) seperti pencemaran senyawa estrogenik yang berasal dari limbah domestik dan industri akan mengganggu sistem endokrin dan berpengaruh terhadap fungsi *estrogen receptor* pada hormon yang ada dalam tubuh kerang hijau (*Perna viridis*).
 - d. Fungsi *estrogen receptor* yang terganggu dapat menyebabkan keabnormalan pada organisme seperti diferensiasi seksual, waktu kematangan gonad dan gangguan reproduksi lainnya yang berdampak pada kelangsungan hidup populasi kerang hijau (*Perna viridis*) pada waktu yang akan datang.
 - e. Pencemaran perairan dapat mengganggu ekosistem yang ada di perairan tersebut. Kandungan bahan pencemar di perairan akan terakumulasi pada tubuh organisme dan dapat mengakibatkan penurunan populasi.

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui ekspresi *estrogen receptor* pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dari perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).

1.4 Kegunaan

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui terjadi atau tidaknya keabnormalan pada gonad kerang hijau di perairan Kaligung Pasuruan, Nguling Pasuruan dan Ngemboh Gresik. Keabnormalan gonad tersebut diduga dari adanya senyawa estrogenik di perairan yang berasal dari sampah.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2018 - April 2019. Pengambilan sampel dilakukan di perairan Ngemboh Gresik, perairan Kaligung Pasuruan dan perairan Nguling Pasuruan. Pengamatan morfologi kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi pada bulan Desember 2018. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran pada bulan Januari 2019. Analisis kadar *estrogen receptor* pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Divisi Biologi KJF Nano Molekuler dan Seluler, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan februari 2019- April 2019.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biologi Kerang Hijau (*Perna viridis*)

2.1.1 Klasifikasi Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Kerang hijau merupakan salah satu kerang ekonomis tinggi yang keberadaannya melimpah di Indonesia. Kerang hijau merupakan binatang lunak (*mollusca*) yang hidup di laut pada daerah litoral. Kerang hijau memiliki sepasang cangkang (*bivalvia*) dan hidup menempel pada substrat. Kerang hijau menempel dengan menggunakan *byssus*, pergerakannya lambat dan mendapatkan makanan dengan cara menyaring (*filter feeder*) partikel-partikel yang ada di tempat hidupnya. Kerang hijau memiliki nama ilmiah *Perna viridis* (Arman dan Supriyanti, 2007).

Adapun klasifikasi dari kerang hijau (*perna viridis*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Mollusca
Class	: Bivalvia
Sub Class	: Lamellibranchiata
Ordo	: Anisomyria
Superfamily	: Mytilacea
Family	: Mytilidae
Sub Family	: Mytilinae
Genus	: <i>Perna</i>
Species	: <i>Perna viridis</i> (Linnaeus, 1758).



Gambar 2. Kerang Hijau (*Perna viridis*), a. Dokumentasi Pribadi (2019), b. McGuire dan Stevely (2009)

2.1.2 Morfologi dan Habitat Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Sari dan Harlyan (2015) menyatakan bahwa kerang hijau memiliki bentuk tubuh agak pipih, cangkangnya padat dan memanjang dan mempunyai umbo (puncak cangkang) yang mengarah ke tepi sentral. Tipe garis pertumbuhannya *concentric* (sepusat), berwarna hijau, kadang-kadang dengan tepi berwarna kebiruan. Kedua cangkang berukuran sama, tetapi salah satu cangkang lebih kembung daripada yang lainnya. Panjang cangkang umumnya dua kali lebarnya. Pada cangkang bagian luar terdapat garis-garis lengkung atau garis umur. Cangkang bagian dalam halus dan berwarna putih mengkilat kepelangian.

Kerang hijau merupakan kerang yang bernilai ekonomis tinggi yang tersebar luas di perairan Indonesia. Kerang hijau dapat ditemukan di perairan pesisir, daerah mangrove dan muara sungai. Kerang hijau memiliki sebaran yang luas mulai dari laut India bagian barat hingga Pasifik Barat, dari teluk Persia hingga Filipina, bagian utara dan timur laut China, Taiwan hingga Indonesia (Cappenberg, 2008). Kerang hijau merupakan salah satu jenis kerang dari golongan *pelecypoda*, memiliki sepasang cangkang (*bivalvia*) yang hidup bergerombol dan menempel pada benda-benda di dasar laut yang berpasir seperti kayu, bambu, batu ataupun substrat yang keras dengan menggunakan *bysuss*. Kerang ini memiliki

kemampuan mengakumulasi logam berat. Berdasarkan cara hidup dan penyebarannya kerang hijau dapat dijadikan sebagai bioindikator (Suseno 2007).

2.1.3 Kebiasaan Makan Kerang Hijau

Liliandari dan Aunurohim (2013) menyatakan bahwa kerang hijau dapat berkembang pesat pada daerah yang memiliki masukan bahan organik yang tinggi. Hal ini dikarenakan kerang hijau merupakan hewan yang memperoleh makanannya dengan cara menyaring (*filter feeder*). *Filter feeder* merupakan cara mendapatkan makanan dengan memompa air melalui rongga-rongga mantel sehingga mendapatkan partikel-partikel yang terdapat di dalam air. Mikroalga merupakan makanan utama dari kerang hijau (*Perna viridis*). Makanan tambahan dari kerang hijau berupa zat organik terlarut dan bakteri.

Kerang hijau dalam mendapatkan makanannya dengan cara menyaring air (*filter feeder*). Air masuk melalui saluran *inhalent* dan dikeluarkan melalui saluran *exhalent*. Materi yang tersaring berupa suspensi dan solid (*non selektif*) yang sebagian akan dijadikan sumber makanan dan sebagian yang tidak dicerna akan dikeluarkan bersamaan dengan *pseudofeses* yang terbungkus dalam lendir (Arman dan Supriyanti, 2007).

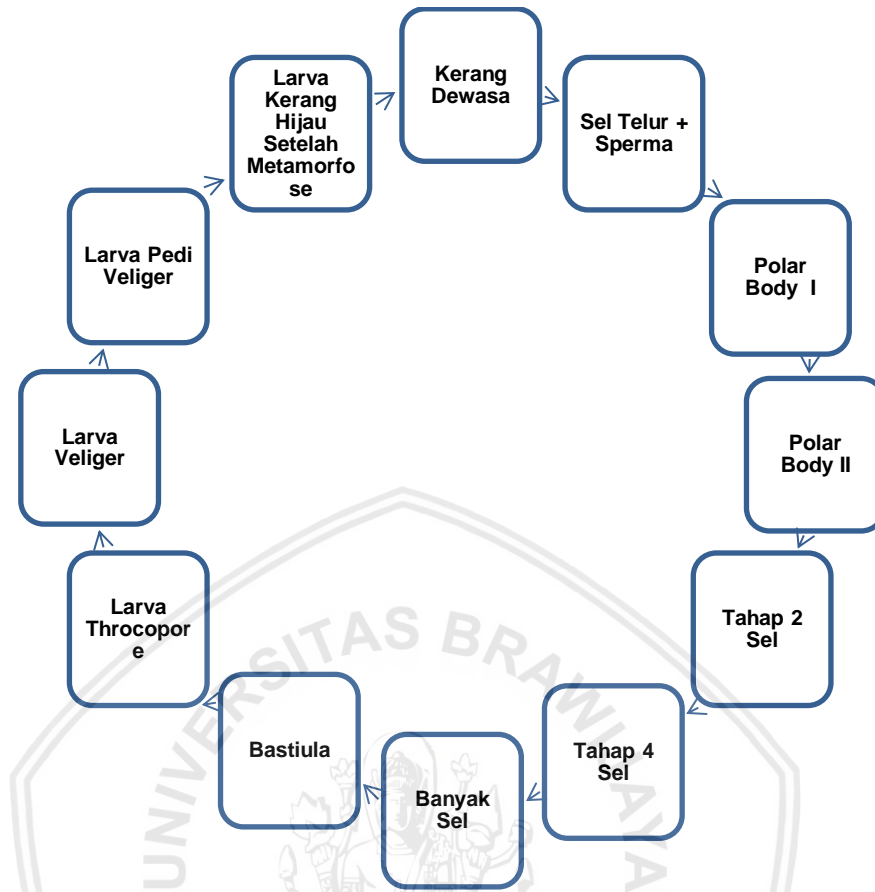
2.1.4 Siklus Reproduksi

Kerang hijau bersifat *dioecious*, yaitu induk kerang jantan dan betina terpisah dan pembuahan terjadi diluar tubuh. Pola sebaran yang mengelompok disebabkan hewan tersebut memilih hidup pada habitat yang paling sesuai di dasar perairan. Hal ini sesuai dengan faktor fisika dan kimia perairan maupun tersedianya makanan (Purba *et al.*, 2014).

Telur yang sudah dibuahi umumnya berbentuk bulat dan berukuran sekitar 50µm, sedangkan yang tidak dibuahi berbentuk lonjong. Sekitar 10-15 menit seetelah pembuahan terbentuklah *polar body* (sel kecil yang terpisah dari telur

pada tingkat permulaan kematangannya) pertama dan pada 15 menit selanjutnya terbentuklah *polar body* kedua. *Cleavage* I selesai pada 30-45 menit dengan terbentuknya 2 buah sel yang berukuran tidak sama. *Cleavage* II dimulai dengan terjadinya pembelahan *micromere* selama 15 menit kemudian dan akhir dari *cleavage* II di tandai dengan terbentuknya tahapan 4 sel yang membutuhkan waktu 40-75 menit. Pada waktu 3-4 jam terbentuklah *blastula* yang berenang bebas. Tahap *blastulasi* terjadi pada jam 7-8 jam dan pada jam ke 12-15 terbentuk larva *trochophore*. Pada jam ke 16-19 jam merupakan fase *veliger* yaitu fase dimana bagian tubuh yang lunak mulai ditutupi dengan cangkang. Pada hari ke 8 otot kaki mulai digunakan untuk merayap dan disebut dengan fase *pediveliger* yaitu fase dimana *veliger* merayap dan berenang dengan bebas. (Cappenberg, 2008).

Cara membedakan kerang hijau jantan dan betina dapat dilihat berdasarkan bentuk gonad, perbedaan warna antara jantan dan betina, ketebalan serta kenampakan saluran pencernaan (Widasari *et al.*, 2013). Kerang jantan dan betina dapat dibedakan berdasarkan warna gonad. Gonad kerang jantan berwarna cream sedangkan gonad kerang betina berwarna oren (Akbar *et al.*, 2014).



Gambar 3. Perkembangan Sel Telur Kerang Hijau Setelah Dibuih Hingga Selesai Metamorfosa (Tan, 1975)

2.1.5 Tingkat Kematangan Gonad

Tingkat kematangan gonad (TKG) adalah tahap tertentu perkembangan gonad sebelum dan sesudah memijah. Perkembangan tingkat kematangan gonad (TKG) dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti parameter kualitas air nutrisi dan pakan. Pakan yang dapat mempengaruhi vitelogenesis adalah pakan yang mengandung protein, lemak, vitamin E, vitamin C dan mineral yang sesuai dengan kebutuhan organisme sebagai bahan pembentuk vitellogenin. Protein merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan dalam proses reproduksi terutama saat pematangan gonad. Pakan yang tidak optimal menyebabkan kurangnya energi untuk mendukung proses reproduksi, terutama dalam mensintesis hormone yang terlibat dalam perkembangan telur seperti estradiol 17 β (Sinjal *et al.*, 2014).

Gonad merupakan organ tubuh yang paling berperan dalam proses perkembangbiakan, sehingga perkembangan gonad yang baik sangat diperlukan untuk mendapatkan benih yang berkualitas (Widasari *et al.*, 2013). Untuk membedakan kerang jantan dan betina dapat dilakukan dengan melihat pada warna gonad. Gonad kerang jantan biasanya berwarna krem (putih) sedangkan gonad pada kerang betina berwarna oren cerah (Cappenberg, 2008).

2.2 Sistem Endokrin

2.2.1 Hormon

Hormon merupakan zat kimia dalam bentuk senyawa organik yang dihasilkan oleh kelenjar endokrin. Hormon berperan dalam mengatur aktivitas metabolisme, reproduksi, pertumbuhan dan perkembangan. Pengaruh hormon dapat terjadi dalam waktu yang berbeda-beda yaitu dapat terjadi dalam beberapa detik, hari, minggu, bulan bahkan beberapa tahun. Hormon dari kelenjar endokrin mengikut peredaran darah ke seluruh tubuh hingga mencapai organ-organ tertentu. Meskipun hormon mengadakan kontak dengan semua jaringan yang ada didalam tubuh, hanya sel jaringan yang mengandung reseptor spesifik terhadap hormon tertentu yang terpengaruh oleh hormon tersebut (Purwanto, 2011). Reseptor khusus tersebut sebagai reseptor hormon. Interaksi hormon dengan sel sasaran biasanya terjadi melalui pembantuan kompleks hormon reseptor. Reseptor tersebut hanya akan berkaitan dengan hormon tertentu, yaitu senyawa lain yang mempunyai gugus fungsional sangat mirip dengan gugus fungsional hormon yang dimaksud. Kemampuan suatu hormon mempengaruhi sel sasaran ditentukan oleh keberadaan reseptor khusus untuk hormon tersebut pada sel. Apabila reseptor khusus tidak ada untuk suatu jenis hormon, suatu sel tidak akan dianggap terhadap hormon yang dimaksud sekalipun hormon tersebut ada didekatnya (Isnaeni, 2006).

2.2.2 Hormon Estrogen

Estrogen merupakan seks steroid yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan seksual skunder seperti kelenjar mammae dan organ reproduksi yang lain. Estradiol merupakan bentuk hormon estrogen yang paling poten dan dijumpai dengan jumlah yang cukup tinggi di dalam tubuh. Hormon estrogen selain mempengaruhi kadar estradiol juga mempengaruhi organ reproduksi (Narulita *et al.*, 2016). Estrogen yang terdapat secara ilmiah adalah 17β estradiol, estron dan estriol dimana 17β estradiol adalah yang paling dominan. Zat-zat ini adalah steroid C_{18} . Hormon-hormon ini disekresikan oleh teka interna dan sel granulosa folikel ovarium, korpus luteum dan plasenta. Estrogen juga dibentuk melalui aromatisasi androstenedion di dalam sirkulasi (Mahmudiati, 2011). Estrogen dibentuk oleh sel-sel granulosa dalam folikel ovarium melalui serangkaian konversi melalui reaksi enzimatik (Sitasiwi, 2008). Estrogen pada ikan betina mengatur ekspresi gen yang mengendalikan sintesis protein. Estrogen disekresikan ke dalam darah dan melalui jalur reseptor estrogen mengaktifkan produksi vitelogenin. Pada vitelogenesis hormon estrogen yang dihasilkan ovarium dilepaskan ke dalam darah kemudian merangsang hati untuk mensintesis vitelogenin (Setyawati *et al.*, 2011).

2.2.3 Estrogen Receptor (ER)

Hormon estrogen merupakan hormon yang mempengaruhi kelenjar reproduksi. *Estrogen Reseptor* (ER) adalah salah satu anggota reseptor inti yang berfungsi sebagai perantara aksi hormon estrogen di dalam tubuh (Lubahn *et al.*, 1993). *Estrogen reseptor* (ER) dalam jaringan tubuh terdiri dari dua macam yaitu ER β dan ER α dengan tempat distribusi yang berbeda. Reseptor α lebih banyak terdistribusi pada jaringan penyusun organ reproduksi sedangkan reseptor β terdistribusi diluar jaringan reproduksi (Sitasiwi, 2009). Fungsi utama ER adalah

sebagai transkripsi pengikat DNA dan mengatur ekspresi gen yang selanjutnya akan direspon. Ada 3 jenis reseptor yaitu reseptor estrogen (ER), reseptor estrogen terikat membran (*nuclear ER*) dan estrogen G protein yang terikat dengan reseptor (GPR30) yang merupakan protein yang terikat membran dengan afinitas tinggi terhadap estrogen (Schung *et al.*, 2011).

Mahmudiati (2011) menyatakan bahwa *estrogen receptor* (ER) disintesis oleh beberapa tipe sel dalam dua isoform yaitu ER β dan ER α . Distribusi ER β dan ER α terdapat berbagai target organ antara lain *endometrium, uterus, oviduct, cervix/vagina* tulang, otak, pembuluh darah, jantung sistem imun, kulit, ginjal dan paru-paru. ER β lebih banyak ditemukan di ovarium, prostat, paru dan hipotalamus. ER β memiliki peran yang lebih kecil dalam memperantarai aksi biologi estrogen di uterus, hipotalamus dan pada tulang. Estrogen Reseptor (ER) termasuk anggota superfamili dari *nuclear receptor*.

2.3 Senyawa Estrogenik dan *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs)

Senyawa estrogenik atau *xenoestrogen* merupakan senyawa yang dapat menyebabkan efek buruk pada organisme seperti mengganggu produksi hormon, menurunkan kualitas dan kuantitas sperma, menyebabkan terjadinya feminisasi dan menyebabkan ovarium tumbuh secara abnormal (Zoeller *et al.*, 2012). Senyawa ini mampu berkaitan dengan *estrogen receptor* (ER) pada inti sel organisme. Senyawa estrogenik dapat dibedakan menjadi senyawa estrogenik buatan dan alami. Senyawa estrogenik buatan masuk ke dalam perairan berasal dari berbagai sumber seperti kegiatan pertanian (DDT, endrin, deildrin) dan kegiatan industri (bahan penyusun plastik dan detergen, dioksin). Sedangkan senyawa estrogen alami adalah senyawa yang dihasilkan oleh organisme misalnya senyawa dari jamur, tumbuhan, hasil ekskresi manusia maupun hewan

yaitu feses dan urin (Syamsuri, 2006). EDCs bukanlah hormon tetapi menyerupai hormon atau bisa disebut sebagai hormon tiruan (Schung *et al.*, 2011).

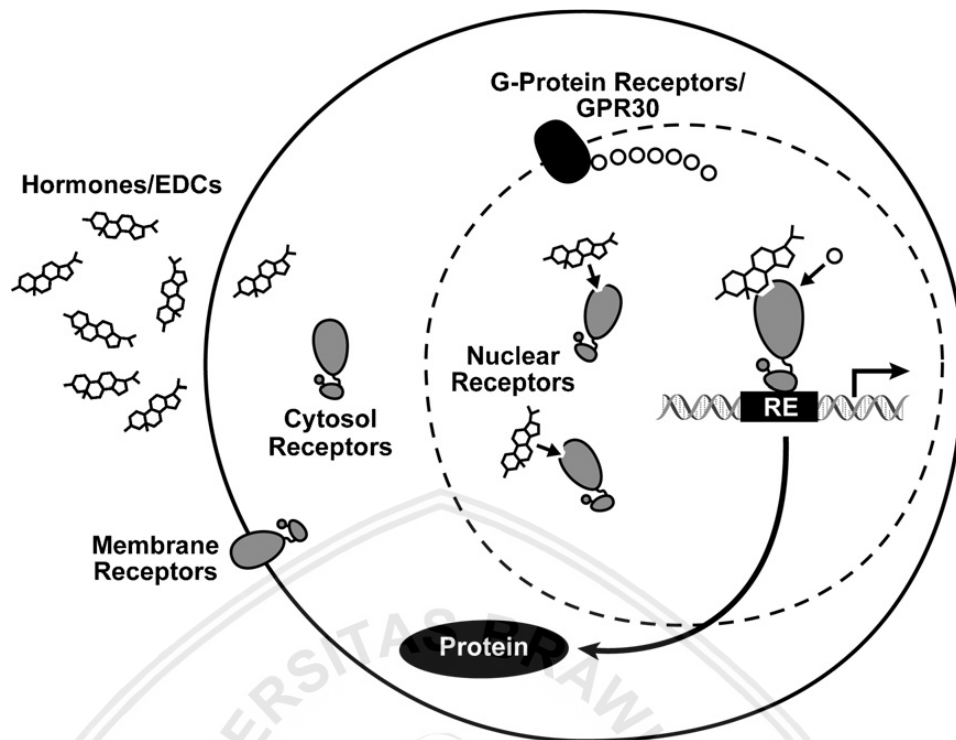
Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) merupakan agen eksogen yang mengganggu sintesis, sekresi, pengangkutan, metabolisme, aktivitas pengikatan atau merusak hormon yang dibawa darah di dalam tubuh yang bertanggung jawab dalam homeostasis, reproduksi dan proses perkembangan (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Bahan kimia sintesis yang termasuk kedalam EDCs adalah bahan yang digunakan sebagai pelarut industri dan produk sampingnya seperti bifenil polibrominat (PBBs), dioksin, plastik, pestisida, fungisida, insektisida dan sebagainya. EDCs merupakan bahan pencemar air sungai yang berdampak sangat luas. EDCs mampu mengubah interaksi gen lingkungan melalui perubahan fisiologi, seluler, molekuler dan epigenetik sehingga menghasilkan efek pada individu dan keturunannya (Hamzah *et al.*, 2018).

2.4 Mekanisme Pencemaran Terhadap Estrogen Receptor (ER)

Senyawa estrogenik merupakan senyawa yang dapat mengganggu produksi hormon dan dapat menyebabkan feminisasi. Senyawa ini mampu berkaitan dengan estrogen reseptor pada inti sel organisme. *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs) merupakan zat eksogen atau zat yang berasal dari lingkungan luar atau suatu zat campuran bahan kimia yang mengubah fungsi dari sistem endokrin yang mengakibatkan menurunnya kesehatan pada suatu organisme dan keturunannya (Saputri *et al.*, 2018). EDCs dapat mengganggu sistem hormonal. Jenis dan intensitas dampak dari EDCs tergantung dari jenis spesies, konsentrasi dan lamanya paparan. EDCs merupakan imitasi hormon endogen yang dapat memberikan dampak seperti dampak agnoistik (misalnya bahan kimia mengikat dan mengaktifkan reseptor hormon alami) atau dampak antagonis (misalnya bahan kimia menghambat aksi reseptor). Sehingga, dengan bertindak sebagai

ligan untuk hormon reseptor (ER) pengganggu endokrin dapat mengganggu sistem endokrin (Milla *et al.*, 2011).

EDCs dapat mempengaruhi proses pemberian sinyal oleh Estrogen reseptor yang terdapat pada sistem reproduksi organisme. Zat EDCs tidak dapat terdegradasi dengan mudah dan akan terakumulasi pada tubuh makhluk hidup melalui rantai makanan, sehingga zat EDCs sangat berbahaya meskipun dalam jumlah yang kecil (Ratnaningsih, 2016). Mekanisme masuknya EDCs ke dalam tubuh yaitu melalui mekanisme masuknya paparan pestisida. Pestisida yang masuk melalui inhalasi, permukaan kulit, maupun sistem pencernaan. Kemudian akan masuk ke dalam peredaran darah dan akan masuk ke dalam organ. EDCs yang terserap akan mempengaruhi sel beta dalam tubuh. Hormon atau hormon tiruan berikatan dengan membran reseptor atau sitosol setelah itu berpindah ke nukleus dan menempelkan diri pada elemen respon (RE) dimana mereka bertugas untuk mengatur transkripsi gen dan produksi protein. Beberapa reseptor hanya tinggal dalam nukleus di atas elemen respon (ER) dalam bentuk tidak aktif dan akan aktif setelah terjadi pengikatan hormon. EDC dapat mengubah proses pensinyalan dengan mengikat reseptor estrogen dan keduanya mengaktifkan atau menghambat respon transkripsi atau pengekspresian. Ilustrasi pensinyalan reseptor hormon dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Pensinyalan Reseptor Hormon (Schung *et al.*, 2011)

2.5 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) merupakan alat yang digunakan untuk melihat sampel yang bekerja dengan metode *fluoresensi* dan menggunakan teknik filtrasi spasial. *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) memiliki resolusi yang tinggi pada gambar optik dengan kedalaman yang selektif. Mikroskop ini memiliki kemampuan untuk mendapatkan gambar yang fokus dari kedalaman yang dipilih, proses tersebut dikenal sebagai *optic sectioning*. Gambar diperoleh secara bertahap dan kemudian hasil dari mikroskop akan dimasukkan ke dalam komputer yang khusus beroperasi dengan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) (Pawley, 2006). Tortora (2006) menyatakan bahwa pengamatan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) seperti pada mikroskop *fluoresensi* yaitu mengamati sampel berdasarkan adanya perpendaran warna atau *fluorescence*. Untuk sampel yang yang tidak berpendar dapat ditambahkan dengan zat pewarna yang dapat berpendar dan mampu

berkaitan dengan sampel yang diamati. Mikroskop ini menggunakan penerangan berupa sinar laser dan dapat dihubungkan dengan komputer sehingga mampu menghasilkan gambar tiga dimensi.

2.6 Kelebihan dan Kelemahan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM)

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) memiliki kelebihan yaitu adanya penampang yang mencegah terjadinya kerusakan pada stuktur sampel, mampu mengontrol kedalaman bidang pandang dan dapat mengeliminasi *background* yang tidak diinginkan (Jekle dan Becker, 2010). Hal ini sesuai dengan pernyataan Parlina (2019) bahwa mikroskop konfokal memiliki kelebihan yaitu memiliki resolusi yang tinggi karena adanya penghapusan cahaya di luar fokus pada kedalaman yang diinginkan, sensitivitas serta kemampuan untuk menghasilkan bagian optik serial (gambar optikal dengan resolusi tinggi dan fokus kedalaman tertentu) sampel fluoresensi massal seperti jaringan dan adanya analisis pencitraan 3 dimensi. Pengurangan latar belakang fluoresensi dan peningkatan sinyal ke gambar tercapai sehingga struktur kontras dan struktur yang terdefinisi lebih tinggi. Kelebihan lain dari mikroskop konfokal adalah kemampuan untuk mengatur perbesaran secara elektronik yaitu dengan cara memvariasi area yang dipindai dengan menggunakan laser tanpa harus mengubah objektif. Sedangkan kelemahannya adalah adanya bahaya terkena intensitas radiasi laser yang tinggi untuk jaringan dan sel hidup (Olympus Corporation, 2012).

2.7 Pengukuran Kualitas Air

2.6.1. Parameter fisika

a. Suhu

Suhu perairan berperan penting terhadap pertumbuhan biota perairan. Suhu dapat mempengaruhi proses fotosintesis di perairan baik secara langsung maupun tidak langsung. Pengaruh langsung karena reaksi kimia enzimatik yang berperan dalam proses fotosintesis dikendalikan oleh suhu. Peningkatan suhu hingga batas tertentu akan menaikkan laju fotosintesis. Sedangkan pengaruh tak langsung adalah karena suhu akan menentukan struktur hidrologis suatu perairan dimana fitoplankton berada (Khasanah *et al.*, 2013). Suhu dapat mempengaruhi biota atau organisme perairan karena mempengaruhi proses metabolisme yang terjadi dalam tubuh kerang hijau. Peningkatan suhu dapat menyebabkan penurunan daya larut oksigen terlarut dan juga akan menaikkan daya racun bahan-bahan tertentu (Wardani *et al.*, 2014).

2.6.2. Parameter kimia

a. *Dissolved Oxygen (DO)*

Dissolved oxygen (DO) adalah jumlah oksigen yang terkandung di dalam air. DO dibutuhkan oleh semua jasad hidup untuk oksidasi bahan-bahan organik dan anorganik dalam proses aerobik. Sumber utama oksigen dalam perairan adalah difusi dari udara bebas dan hasil fotosintesis organisme yang hidup dalam perairan tersebut. Kecepatan difusi di perairan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kekeruhan air, suhu, salinitas, arus, gelombang dan pasang surut (Saputri *et al.*, 2014). Penurunan kadar oksigen terlarut mempunyai dampak yang penting terhadap organisme perairan bahkan dapat menimbulkan kematian. Kebutuhan

oksigen setiap organisme berbeda-beda. Keberadaan logam berat yang berlebihan didalam perairan dapat mempengaruhi sistem respirasi organisme akuatik, sehingga pada saat kadar oksigen terlarut rendah dan terpapar logam berat dengan konsentrasi tinggi, organisme akuatik tidak akan tumbuh dengan baik (Effendi, 2003).

b. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman atau pH merupakan indikasi bobot hidrogen yang ada di dalam air. Kisaran nilai pH diukur dalam skala 1-14. Derajat keasaman sangat berpengaruh pada adaptasi organisme perairan. pH dipengaruhi oleh aktifitas fotosintesis, suhu dan terdapatnya ion. Kondisi perairan yang bersifat asam maupun basa akan menyebabkan gangguan metabolisme dan respirasi pada organisme. Selain itu pH yang sangat rendah akan menyebabkan mobilitas berbagai senyawa logam berat yang bersifat toksik akan semakin tinggi (Adani *et al.*, 2013). Rendahnya nilai pH mengindikasikan menurunnya kualitas perairan yang pada akhirnya akan berdampak pada kehidupan biota, karena jaringan makanan dalam perairan terganggu. Pada pH rendah kandungan DO akan berkurang karena terjadinya peningkatan aktivitas pernafasan dan penurunan selera makan, sehingga konsumsi oksigen menurun, aktivitas pernafasan naik dan selera makan akan berkurang (Susana, 2009).

c. Sallinitas

Salinitas merupakan jumlah garam yang terkandung dalam air. Salinitas sangat berhubungan erat dengan osmoregulasi hewan air. Apabila terjadi penurunan salinitas secara mendadak dan dalam kisaran yang cukup besar maka akan menyulitkan hewan dalam mengatur osmoregulasi tubuhnya sehingga dapat menyebabkan kematian. Salinitas merupakan bagian terpenting untuk membatasi

ekspansi distribusi berbagai spesies kerang-kerangan. Spesies kerang hijau memiliki rentang toleransi salinitas yang luas, hal ini menyebabkan distribusi dari spesies ini dapat menjangkau perairan yang luas. Kerang hijau dapat tumbuh dengan baik pada habitat estuari dengan kisaran salinitas 18-33 ppt (Temmy *et al.*, 2017). Salinitas juga dapat mempengaruhi keberadaan logam berat di perairan, bila nilai salinitas menurun maka akan menyebabkan peningkatan daya toksik logam berat dan tingkat akumulasi logam berat semakin besar (Eshmat *et al.*, 2014).

2.8 Penelitian Terdahulu

Penelitian mengenai estrogen reseptor pada moluska telah dilakukan sebelumnya. Penelitian terkait mengenai estrogen reseptor pada moluska dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Penelitian Terdahulu Mengenai Estrogen Receptor (ER) Pada Moluska

No.	Spesies	Lokasi penelitian	Metode	Hasil	Referensi
1	<i>Crassostrea angulata</i>	Zhangzhou, Fujian, China	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	ER pada gonad terekspresi secara signifikan, sedangkan ER pada mantel, insang dan <i>visceral mass</i> tidak terekspresi secara signifikan	Ni <i>et al.</i> (2013)
2	<i>Mytilus edulis</i> dan <i>Mitilus galloprovincialis</i>	Brighton, Inggris dan Teluk Onagawa, Miyagi, Jepang	Analisis <i>Phylogenetik</i>	Ekspresi kedua mRNA reseptor terlokalisasi pada oosit dan folikel yang berhubungan dengan sel-sel pengembangan	Nagasawa <i>et al.</i> (2015)

Lanjutan tabel 1.

				oosit dan ovarium. Satu ER memiliki kapasitas untuk mengatur sendiri ekspresinya dalam sel gonad oleh E2 dan gen tersebut responsif terhadap senyawa estrogenic.	
3	<i>Scallop Chlamys farreri</i>	Laut Kuning, Qingdao, China	RACE –PCR	Peningkatan ekspresi mRNA ER dan VTG signifikan pada paparan 0,4 dan 2µg/l, menurun pada paparan 10µg/l. ER tertinggi ditemukan pada gonad jantan dan betina.	Zhang <i>et al.</i> (2012)
4	<i>Mitilus galloprovincialis</i>	Teluk Biscay, Prancis	<i>Hybaid ribolyser</i>	ER ditranskripsi lebih banyak pada mantel dan kelenjar pencernaan	Raingard <i>et al.</i> (2013)
5	<i>Mytilus edulis</i>	Pelabuhan Newhaven, Inggris	Mikroskop cahaya	Ekspresi ER pada jantan lebih tinggi dari pada betina	Ciocan <i>et al.</i> (2010)
6	<i>Bithynia tentaculata</i>	Aplysia, California dan Thailand	TRizol® (Invitrogen)	ER pada <i>Bithynia tentaculata</i> adalah ortolog bagi Era manusia. Ekspresi ER signifikan pada siput betina	Hultin <i>et al.</i> (2014)
7	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Hesse, Jerman	<i>Bayesian Markov Chain Monte Carlo</i>	Tingkat E2 lebih tinggi pada siklus reproduksi.	Stange <i>et al.</i> (2012)



Lanjutan tabel 1.

				Eksresi ER pada jantan lebih tinggi daripada ER betina. Eksresi ER pada jantan akan meningkat pada fase matang.	
8	<i>Parafossarulus striatulus</i>	Hubei, China	<i>Neighbor Joining Method</i>	Paparan E2 tidak mempengaruhi transkripsi pada ER jantan dan betina tetapi paparan metil testosteron mempengaruhi transkripsi ER pada betina.	Ma <i>et al.</i> (2019)
9	<i>Marisa cornuarietis</i>	Brunei University, UK	<i>Quantitative real-time PCR (QPCR)</i>	Tidak ada interaksi secara langsung antara E2 dan 4-tert octylphenol dengan ekspresi ER (tidak signifikan)	Bannister <i>et al.</i> (2013)
10	<i>Neomysis japonica</i>	China	Mikroskop cahaya	Tingkat estrogen pada ovarium lebih tinggi pada awal tahap ovarium. ER dideteksi pada oosit dan folikel.	Yang <i>et al.</i> (2012)

3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kerang hijau (*Perna viridis*) yang diambil dari perairan pantai utara yaitu perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik, Jawa Timur dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Parameter pendukung kualitas air meliputi parameter fisika dan kimia yaitu suhu, pH, DO dan salinitas. Kemudian dilanjutkan dengan penelitian laboratorium yang meliputi pengamatan morfologi gonad kerang hijau (*Perna viridis*) di Laboratorium Budidaya Divisi Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Setelah itu membuat preparat gonad kerang hijau (*Perna viridis*) di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Pewarnaan preparat gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Divisi Biologi Molekuler dan Seluler, Universitas Brawijaya, Malang. Analisis intensitas *estrogen receptor* (ER) pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) yang dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Divisi Biologi KJF Nano Molekuler dan Seluler.

3.2 Alat dan Bahan

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

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif. Metode deskriptif merupakan metode yang ditujukan untuk menggambarkan fenomena-fenomena yang ada, yang berlangsung pada saat ini atau saat yang lampau.

Penelitian deskriptif dapat mendeskripsikan suatu keadaan dalam tahapan-tahapan perkembangannya. Penelitian deskriptif menggambarkan suatu kondisi apa adanya. Penggambaran kondisi seperti individual atau kelompok dan menggunakan angka-angka (Hamdi dan Bahruddin, 2015).

3.4 Teknik Pengambilan Data

3.4.1 Data Primer

Data primer merupakan data yang diperoleh langsung dari narasumber data. Data primer juga sering disebut sebagai data asli. Data primer diperoleh melalui tiga cara yaitu wawancara, observasi dan partisipasi aktif (Batubara, 2013). Wawancara merupakan metode dimana mengumpulkan data diperoleh dengan cara bertanya langsung kepada pihak yang mengetahui masalah tersebut. Metode wawancara memiliki kelebihan yaitu data atau informasi yang diperoleh lebih mendalam dan tepat. Sedangkan kelemahan metode wawancara adalah terlalu banyak memakan waktu, tenaga dan biaya (Rahardjo dan Gudnanto, 2012). Observasi merupakan metode pengumpulan data dengan pengamatan secara langsung (Dewi, 2016). Partisipasi merupakan peran serta seseorang terhadap suatu kegiatan. Peneliti mengikuti apa yang dikerjakan seseorang, mendengarkan apa yang mereka katakan dan berpartisipasi atau ikut serta dalam aktifitas mereka. Partisipasi dapat digolongkan menjadi empat yaitu partisipasi pasif, partisipasi moderat, partisipasi terus terang dan tersamar dan partisipasi lengkap (Musyafak dan Ibrahim, 2005).

Data primer yang digunakan berupa partisipasi aktif yaitu peneliti ikut serta pada saat mengambil sampel, membedah kerang hijau (*Perna viridis*) dan menganalisa di laboratorium kemudian mencatat hasil yang diperoleh.

3.4.2 Data Skunder

Data skunder merupakan data yang diperoleh dari dokumen yang terkait dengan masalah yang diteliti serta literatur-literatur yang berkaitan dengan masalah penelitian. Data skunder diperoleh dari sumber-sumber yang telah ada (Sedena dan Wijaya, 2010).

3.5 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di lapang maupun di laboratorium, yaitu:

- Pengambilan sampel kerang hijau (*perna viridis*) dilakukan di perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik, Jawa Timur.
- Pengamatan morfologi gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Pembuatan preparat gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.
- Pewarnaan preparat gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Divisi Molekuler dan Seluler, Universitas Brawijaya, Malang.
- Analisa ekspresi *estrogen receptor* (ER) pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Divisi Biologi KJF Molekuler dan Seluler, Universitas Brawijaya, Malang.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Sampel Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Pengambilan sampel kerang hijau (*Perna viridis*) di perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik dilakukan dengan cara ke tengah laut dengan menaiki kapal nelayan setempat. Nelayan menyelam kedalam perairan sedalam 5 meter untuk megambil kerang hijau dengan menggunakan alat tangkap sosrok dan penggaruk. Kerang hijau pada perairan Ngemboh Gresik, perairan Kaligung dan perairan Nguling Pasuruan merupakan hasil budidaya nelayan setempat. Kerang hijau yang ditangkap kemudian dimasukan ke dalam *coolbox* yang diberi air dan aerasi. Kerang hijau dibawa ke Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang untuk diukur Panjang, lebar dan berat total tubuhnya.

Kerang hijau yang ditangkap kemudian diukur Panjang dan lebar cangkang dengan menggunakan jangka sorong. ditimbang berat totalnya dengan menggunakan timbangan digital makro. Setelah itu kerang hijau dibedah dengan menggunakan *sectio set* dan diamati tingkat kematangan gonadnya. Kemudian gonad diambil dan ditimbang dengan menggunakan timbangan digital analitik di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya, Malang. Setiap lokasi diambil 6 sampel yang terdiri dari 3 sampel jantan dan 3 sampel betina. Gonad yang telah diambil dimasukan ke dalam botol film yang telah diberi formalin 10% dan ditandai dengan label. Pemberian larutan formalin bertujuan untuk pengawetan. Setelah itu sampel dibawa ke Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

3.6.2 Pengamatan Tingkat Kematangan Gonad Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Metode yang digunakan dalam pengamatan tingkat kematangan gonad (TKG) adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Deskripsi morfologi tingkat kematangan gonad (TKG) kerang hijau (sreenivasan *et al.*, 1989):

No.	TKG	Jantan	Betina
1.	I	Gonad cukup berkembang dan telah mencapai 2/3 dari ukuran akhir gonad. Gametogenesis dimulai dan folikel mengandung gamet yang sedang berkembang.	Gonad cukup berkembang dan telah mencapai 2/3 dari ukuran akhir gonad. Gametogenesis dimulai dan folikel mengandung gamet yang sedang berkembang.
2.	II	Gonad sepenuhnya membesar. Folikel penuh dengan sperma matang.	Gonad sepenuhnya membesar. Ovum matang dan mengisi seluruh ruang folikel.
3.	III	Gonad menjadi lunak dan terlihat jelas. Pada jantan berwarna krem kekuningan.	Gonad menjadi lunak dan terlihat jelas. Pada betina berwarna oren kemerahan.
4.	IV	Kematangan seksual telah tercapai. Sebagian besar folikel kosong dan tersisa sedikit gamet	Kematangan seksual telah tercapai. Sebagian besar folikel kosong dan tersisa sedikit gamet

3.6.3 Preparasi Histologi

Pembuatan preparat gonad kerang hijau (*Perna viridis*) dilakukan di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Ferdinandus (1993), menyatakan bahwa metode preparasi gonad kerang hijau

(*Perna viridis*) sebelum dilakukan pengamatan ekspresi *estrogen reseptor* dengan menggunakan CLSM adalah sebagai berikut :

1. Fiksasi (*Fixation*)

Fiksasi dilakukan dengan cara memasukkan gonad kerang hijau (*Perna viridis*) kedalam formalin 10%. Setelah itu dipotong membujur dan dimasukkan ke dalam tissue tex.

2. Dehidrasi (*Dehydration*)

Dehidrasi dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi meningkat berturut-turut yaitu larutan alkohol 70% I, alkohol 70% II, alcohol 90% III, alcohol absolut I dan II masing -masing selama 45 menit.

3. Penanaman sampel (*Embedding*) dan Pengeblokan (*Blocking*)

Sampel gonad dimasukkan kedalam larutan paraffin I, paraffin li masing-masing selama 45 menit. Kemudian diambil dan dimasukkan kedalam cetakan stailles steel yang sudah dipanaskan di atas hot plate. Setelah sampel ditata diatas cetakan, paraffin cair dituangkan di atas cetakan sampai membenamkan seluruh potongan sampel.

4. Pemotongan (*Sectioning*) dan peletakan pada gelas objek

Block dimasukkan ke dalam microtom yang sudah disetel dengan ketebalan 5-6 mikron. Pemotongan dilakukan secara pelan dan konstan. 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.

5. Affixing

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

3.6.4 Imunohistokimia

Setelah preparat siap maka diberi perlakuan lebih lanjut di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang. Perlakuan yang dilakukan merupakan penghilangan parafin dan pewarnaan dengan imunofluoresen. Adapun urutan kerjanya adalah sebagai berikut:

1. Deparafinisasi

Deparafinisasi adalah proses penghilangan parafin atau pembebasan jaringan dari parafin. Salah satu metode deparafinisasi yaitu metode pemanasan dalam larutan dengan pH basa dan dengan menggunakan larutan *xylene* (Sentani *et al.*, 2017).

2. Staining (Pewarnaan antibodi)

Preparat yang telah di deparafinisasi kemudian diproses untuk *imunofluoresensi* dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Preparat dicuci dengan larutan *xylol* 1 dan larutan *xylol* 2 masing-masing selama 10 menit
- b. Preparat direndam dengan etanol absolut 1, etanol absolut 2, etanol 90%, etanol 70%, larutan *Phospat Buffer Saline Tween 20* (PBST) 1, PBST 2 dan PBST 3 masing-masing selama 5 menit
- c. preparat direndam dengan larutan *buffer sitrat* pH 6, 10 Mm dan dioven selama 15 menit dengan suhu 120°C
- d. Preparat dan wadah dikeluarkan dari oven dan ditunggu \pm 10 menit.

- e. Preparat direndam dan dicuci dengan larutan *Phospat Buffer Saline Tween 20* (PBST) 3 x 5 menit menggunakan alat *platform shakers-rocking*.
- f. Dilakukan blocking dengan *Bovine Serum Albumin* (BSA) 2% dalam *Phospat Buffer Saline Tween 20* (PBST) pada suhu ruang selama 1 jam
- g. Preparat direndam dan dicuci dengan larutan *Phospat Buffer Saline Tween 20* (PBST) 3 x 8 menit menggunakan alat *platform shakers-rocking*.
- h. Preparat direndam dengan antibodi primer yang sudah terconjugasi (antibodi estradiol FITC dan antibodi estrogen receptor TRITC) dalam *Bovine Serum Albumin* (BSA) selama 1 jam pada ruangan gelap.
- i. Preparat direndam dan dicuci dengan larutan *Phospat Buffer Saline Tween 20* (PBST) 3 x 8 menit menggunakan alat *platform shakers-rocking*.
- j. Preparat ditetesi dengan gliserol 10% dan ditutup dengan *cover glass*

3.6.5 Teknik Pencitraan dengan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM)

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) merupakan alat yang digunakan untuk kegiatan dalam biologi dan ilmu biomedis. Keuntungan menggunakan CLSM adalah mampu untuk mengumpulkan bagian optik spesiesmen dan dapat mengungkapkan dalam betuk tiga dimensi. Mikroskop ini secara selektif mengumpulkan cahaya dari bagian optik dalam spesiesmen. Hal ini dilakukan dengan cara memindai spesiesmen dengan cahaya dan mengumpulkan sinyal flouresensi yang dipancarkan oleh spesiesmen (Hanrahan *et al.*, 2011). Skala yang digunakan dalam penelitian adalah 30 μm dengan luas area pandang 310 x 310 μm , panjang gelombang untuk TRITC 523 nm dan untuk FITC 488 nm. Adapun langkah-langkah pengamatan sampel dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* adalah sebagai berikut:

- a. Ruangan pengamatan dikondisikan dalam keadaan gelap karena antibodi primer atau immunofluorescence bekerja pada keadaan gelap atau tidak ada cahaya.
- b. *Confocal Laser Scanning Microscopy* dinyalakan
- c. Kemudian sampel diletakan pada alas pengamat mikroskop dan diatur pada perbesaran 100X dan 400X dengan panjang gelombang untuk FITC 488 nm dan TRITC 523 nm.
- d. Setelah itu objek difoto dan dianalisa

3.7 Parameter Kualitas Air Pendukung

3.7.1 Parameter Fisika

a. Suhu

Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan DO meter, Pratama *et al.* (2017) menyatakan bahwa langkah-langkah penggunaan DO meter untuk mengukur suhu adalah sebagai berikut:

- DO meter di tekan tombol "power"
- Probe dicelupkan ke dalam perairan dan ditunggu sampai angka yang tertera pada layar stabil
- Kemudian hasil yang tertera pada layar DO meter dicatat
- Hasil pengukuran suhu dicatat dengan skala °C
- Setelah digunakan DO meter dikalibrasi dengan *aquades* dan dilap dengan tisu

3.7.2 Parameter Kimia

a. Derajat keasaman (pH)

Pengukuran pH menggunakan pH meter. Pratama *et al.* (2017) menyatakan bahwa langkah-langkah penggunaan pH meter adalah sebagai berikut :

- pH meter dinyalakan dengan menekan tombol “on”
- ujung probe pH meter dimasukkan ke dalam perairan. Lalu ditunggu hingga angka pada pH meter stabil
- nilai pH yang tertera pada layar dicatat
- setelah selesai digunakan, pH meter dikalibrasi dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu.

b. Oksigen Terlarut/ *Dissolved Oxygen* (DO)

Pengukuran oksigen terlarut menggunakan DO meter, Pratama *et al.* (2017) menyatakan bahwa langkah-langkah penggunaan DO meter adalah sebagai berikut :

- DO meter dinyalakan dengan menekan tombol “power”
- Probe dimasukan kedalam perairan
- Jika sudah menunjukkan angka konstan, hasil tersebut dicatat di lembar pengamatan
- Setelah digunakan DO meter dikalibrasi dengan aquades dan dilap dengan tisu

c. Salinitas

Pengukuran salinitas menggunakan refraktometer, Pratama *et al.* (2017) menyatakan bahwa langkah-langkah penggunaan refraktometer adalah sebagai berikut :

- Membuka penutup kaca prisma, mengkalibrasi dengan *aquades* dan dibersihkan dengan tisu secara searah
- Mengambil sampel air dan diteteskan ke kaca prisma
- Diarahkan ke sumber cahaya
- Melihat nilai salinitas melalui kaca pengintai dan mencatat hasilnya
- Setelah penggunaan refraktometer dikalibrasi dengan *aquades*

3.8 Analisa Data

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 3 variasi lokasi dengan 3 kali pengulangan. Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) *One – Way* dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika ada perbedaan nyata ($P > 0,05$) maka akan dilanjutkan dengan uji BNT dengan tingkat kepercayaan 95%. Analisa data dilakukan dengan menggunakan *software* SPSS versi 16.0. Analisa ini dilakukan untuk mengetahui perbandingan kadar rata-rata intensitas ekspresi estrogen reseptor pada ketiga stasiun pengamatan. Terjadi perbedaan atau sama pada kadar rata-rata intensitas ekspresi estrogen reseptor antar stasiun.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Keadaan Umum Lokasi Penelitian

4.1.1 Perairan Kaligung Pasuruan

Perairan Kaligung berada di desa Kaligung, Kecamatan Kraton yang terletak di Kabupaten Pasuruan diantara Kecamatan Bangil, Kecamatan Rembang, Kecamatan Pohjentrek, Kecamatan Wonorejo, Kecamatan Kejayaan dan Kota Pasuruan. Kecamatan Kraton terdiri dari 25 desa yang terbagi menjadi 106 dusun, 130 RW dan 408 RT dengan luas wilayah sebesar 90,89 Km² dengan jumlah penduduk 94.060 jiwa. Ada 4 sungai yang melintasi kecamatan Kraton yaitu kali Welang Bawah sepanjang 8 km, kali Kedung Pengaron sepanjang 13 km, kali Cerame sepanjang 11 km dan kali Sumpersuko sepanjang 12 km.

Secara geografis maka Kecamatan ini berada pada 7,30°-8,30° LS serta 112°30'-113°30' BT. Batas wilayah desa Kaligung adalah sebagai berikut :

- Sebelah Utara : Selat Madura
- Sebelah Timur : Kecamatan Pohjentrek serta Kota Pasuruan
- Sebelah Barat : Kecamatan Bangil serta Rembang
- Sebelah Selatan : Kecamatan Wonorejo serta Kecamatan Kejayaan

Kecamatan Kraton berada pada daerah dataran rendah dan dataran tinggi dengan kondisi permukaan tanah yang sedikit miring ke arah Timur dan Utara sekitar 0-3%. Pekerjaan sebagian besar penduduknya adalah dibidang pertanian dan perikanan. Produk utama dari sektor pertanian adalah tanaman padi, palawija dan kacang-kacangan. Sedangkan pada bidang perikanan dibedakan menjadi dua yaitu perikanan laut dan perikanan darat. Perikanan darat meliputi penangkapan

ikan di perairan umum, budidaya pemeliharaan ikan di tambak, kolam dan keramba (Badan Pusat Statistik, 2018).

Pengamatan yang dilakukan di perairan Kaligung berwarna cokelat. Hal ini disebabkan karena sepanjang pesisir desa Kaligung banyak terdapat pemukiman warga, sawah dan tambak. Selain itu juga terdapat pelabuhan perikanan yang aktivitasnya cukup padat untuk kegiatan transportasi kapal nelayan. Sumber mata pencaharian warga sekitar adalah sebagai petani dan nelayan dengan menjala ikan, budidaya kerang hijau dan kegiatan pertambakan. Oleh karena itu dipastikan disana sering terjadi kegiatan rumah tangga dan kegiatan pertanian dimana masyarakat sekitar sering membuang limbah rumah tangga serta limbah pertanian kedalam perairan. Pengambilan sampel kerang hijau dilakukan di tengah perairan Kaligung dengan menaiki kapal nelayan.



Gambar 5. Stasiun 1: Perairan Kaligung Pasuruan (Dokumentasi Pribadi, 2019)

4.1.2 Perairan Nguling Pasuruan

Perairan Nguling berada di desa Nguling, Kecamatan Nguling, Kabupaten Pasuruan dan berada diantara Kecamatan Lekok, Kecamatan Grati dan Kabupaten Probolinggo. Kecamatan Nguling terdiri dari 15 desa yang terbagi menjadi 75 dusun, 116 RW dan 340 RT dengan luas wilayah sebesar 47,23 Km².

Secara geografis Kecamatan Nguling terletak pada 7,30°-8,30° LS serta 112°30'-113°30' BT. Batas wilayah Kecamatan Nguling adalah sebagai berikut:

Sebelah Utara : Kabupaten Sidoarjo serta laut selat Madura

Sebelah Timur : Kabupaten Probolinggo

Sebelah Barat : Kecamatan Lekok

Sebelah Selatan : Kecamatan Grati

Kecamatan Nguling merupakan dataran rendah dengan ketinggian mulai dari 0 m dpl hingga 100 m dpl dengan kondisi permukaan tanah yang relatif datar kerana sebagian besar merupakan daerah pesisir. Pekerjaan sebagian besar penduduknya adalah dibidang pertanian, industri dan perikanan. Produk utama dari sektor pertanian adalah tanaman padi, palawija dan jagung. Industri yang terdapat pada kecamatan Nguling ada dua yaitu industri besar dan kecil. Industri industri tersebut meliputi industri makanan dan minuman, industri kain, industri gerabah, industri anyaman, industri logam, industri kayu dan industri kulit. Sedangkan pada bidang perikanan dibedakan menjadi dua yaitu perikanan laut dan perikanan darat. Perikanan laut yaitu nelayan menangkap ikan ketengah laut. Perikanan darat meliputi penangkapan ikan di perairan umum, budidaya pemeliharaan ikan di tambak, kolam dan keramba (Badan Pusat Statistik, 2018).

Berdasarkan hasil observasi yang dilakukan pada perairan Nguling, perairan tersebut berwarna coklat. Hal ini disebabkan karena sepanjang pesisir desa Nguling banyak terdapat pemukiman warga, kegiatan pertanian, industri, pariwisata dan perikanan. Hal ini menyebabkan tingginya tingkat buangan sampah dan menyebabkan perairan tersebut tercemar. Pengambilan sampel kerang hijau dilakukan ke tengah perairan Nguling dengan menggunakan kapal nelayan setempat.



Gambar 6.Stasiun 2: perairan Nguling Pasuruan (Dokumentasi Pribadi, 2019)

4.1.3 Perairan Ngemboh Gresik

Perairan Ngemboh terletak di desa Ngemboh, kecamatan Ujungpangkah, kabupaten Gresik, Jawa Timur dengan luas wilayah 3,16 Km². Total luas wilayah kecamatan Ujungpangkah adalah 9.483,230 Ha dan terdiri dari sawah, pekarangan, perkebunan, tambak dan pemukiman. Secara geografis kecamatan Ujungpangkah terletak pada 6° 55' 1" LS dan 112° 33' 18" BT. Batas wilayah desa Ngemboh adalah sebagai berikut:

Sebelah Utara : Laut Jawa

Sebelah Timur : Desa Banyuurip

Sebelah Selatan : Desa Cangaan

Sebelah Barat : Kecamatan Panceng

kecamatan ujungpangkah terletak pada ketinggian \pm 3m diatas permukaan air laut. Perairan Ngemboh terdapat di Laut Jawa dimana salah satu sumber airnya berasal dari aliran sungai Bengawan Solo. Pekerjaan sebagian besar penduduknya adalah dibidang pertanian, industri, perdagangan dan perikanan. Produk utama dari sektor pertanian adalah tanaman padi, palawija dan jagung. Industri yang terdapat pada kecamatan Nguling ada dua yaitu industri besar dan

kecil. Industri-industri tersebut meliputi industri makanan dan minuman, industri kain, industri gerabah, industri anyaman, industri logam, industri kayu, industri kulit dan sebagainya. Pada bidang perdagangan meliputi minimarket, pertokoan dan pasar. Sedangkan pada bidang perikanan dibedakan menjadi dua yaitu perikanan laut dan perikanan darat. Perikanan laut yaitu nelayan menangkap ikan ketengah laut. Perikanan darat meliputi penangkapan ikan di perairan umum, budidaya pemeliharaan ikan di tambak, kolam dan keramba (Badan Pusat Statistik, 2017).



Gambar 7. Stasiun 3: Perairan Ngemboh Gresik (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Berdasarkan observasi yang dilakukan, perairan Ngemboh tersebut berwarna coklat. Hal ini disebabkan karena sepanjang pesisir desa Ngemboh banyak terdapat pemukiman warga dan kawasan industri yang menjadi sumber pencemar perairan. Selain itu juga terdapat pelabuhan yang aktivitasnya cukup padat untuk kegiatan transportasi seperti angkut barang dan sebagainya. Perairan ngemboh sering dijadikan tempat wisata warga sekitar untuk memancing ikan dan menjadi sumber mata pencaharian warga sekitar sebagai nelayan khususnya perikanan tangkap dengan menjala ikan dan kegiatan pertambakan. Pengambilan sampel kerang hijau dilakukan di tengah perairan Ngemboh.

4.2. Morfologi Kerang Hijau (*Perna viridis*) dan Tingkat Kematangan Gonad (TKG)

Kerang hijau (*Perna viridis*) yang diamati berasal dari 3 stasiun yaitu stasiun 1 adalah perairan Kaligung Pasuruan, stasiun 2 perairan Nguling Pasuruan dan stasiun 3 perairan Ngemboh Gresik. masing-masing stasiun diambil sampel kerang hijau (*Perna viridis*) sebanyak 6 sampel yaitu 3 jantan dan 3 betina dalam sekali pengambilan. Kerang hijau (*Perna viridis*) yang ditangkap memiliki ciri-ciri morfologi yang sama. Kerang hijau (*Perna viridis*) memiliki sepasang cangkang yang berbentuk pipih serta berbentuk simetris bilateral, cangkangnya padat memanjang, dan memiliki umbo. Pada bagian luar cangkang terdapat garis-garis melengkung yang bentuknya mengikuti tepi cangkang. Lapisan luar cangkang berwarna hijau kebiruan, sedangkan bagian dalam cangkang berwarna putih keperakan. Kerang hijau (*Perna viridis*) memiliki tubuh yang lunak, warna gonad pada jantan berwarna krem keputihan sedangkan pada gonad betina berwarna orange. Ukuran kerang hijau (*Perna viridis*) dari keseluruhan stasiun yang digunakan memiliki berat tubuh sekitar 2,51 gram – 17,82 gram dengan berat gonad antara 0,047 gram – 0,402 gram.

4.2.1. Kerang Hijau (*Perna viridis*) Perairan Kaligung Pasuruan

Jumlah kerang hijau (*Perna viridis*) yang ditangkap dari perairan Kaligung dipilih secara acak dan diambil sebanyak 6 ekor yaitu 3 ekor betina dan 3 ekor jantan dengan berat tubuh sekitar 2,51 gram -3,73 gram, panjang cangkang sebesar 3,27 cm -3,86 cm. Sampel kerang hijau (*Perna viridis*) yang sudah dipilih pada perairan Kaligung memiliki ukuran gonad yang berbeda-beda. Berat gonad kerang hijau di perairan Kaligung adalah antara 0,047 gram-0,091 gram.

Tingkat Kematangan Gonad (TKG) kerang hijau secara morfologi pada penelitian ini menunjukkan bahwa kerang hijau jantan pada perairan Kaligung

berada pada TKG II sedangkan pada kerang hijau betina berada pada TKG III dan TKG IV.

Tabel 3. Tingkat kematangan gonad secara morfologi di perairan Kaligung:

TKG	Jantan	Betina
II	Gonad sepenuhnya membesar, Folikel penuh dengan sperma matang.	-
III	-	Gonad menjadi lunak dan terlihat jelas. Gonad berwarna oren kemerahan.
IV	-	Kematangan seksual telah tercapai. Sebaian besar folikel kosong.

4.2.2. Kerang Hijau (*Perna viridis*) Perairan Nguling pasuruan

Jumlah kerang hijau (*Perna viridis*) yang ditangkap dari perairan Nguling dipilih secara acak dan diambil sebanyak 6 ekor yaitu 3 ekor betina dan 3 ekor jantan dengan berat tubuh sekitar 3,81 gram-7,88 gram, panjang cangkang 4,03 cm -5,55 cm. Berat gonad kerang hijau di perairan Nguling adalah antara 0,059 gram-0,118 gram.

Tingkat Kematangan Gonad (TKG) kerang hijau secara morfologi pada penelitian ini menunjukkan bahwa kerang hijau jantan pada perairan Nguling berada pada TKG III sedangkan pada kerang hijau betina berada pada TKG IV.

Tabel 4. Tingkat kematangan gonad secara morfologi di perairan Nguling

TKG	Jantan	Betina
III	Gonad menjadi lunak dan terlihat jelas. Gonad berwarna krem kekuningan.	-
IV	-	Kematangan seksual telah tercapai. Sebaian besar folikel kosong.

4.2.3. Kerang Hijau (*Perna viridis*) Perairan Ngemboh Gresik

Jumlah kerang hijau (*Perna viridis*) yang ditangkap dari perairan Ngemboh dipilih secara acak dan diambil sebanyak 6 ekor yaitu 3 ekor betina dan 3 ekor jantan dengan berat tubuh sekitar 10,22 gram-17,82 gram, panjang cangkang 5,21 cm -6,41cm. Berat gonad kerang hijau di perairan Ngemboh adalah antara 0,126 gram-0,402 gram. Tingkat Kematangan Gonad (TKG) kerang hijau secara morfologi pada penelitian ini menunjukkan bahwa kerang hijau jantan pada perairan Ngemboh berada pada TKG III dan TKG IV sedangkan pada kerang hijau betina berada pada TKG IV.

Tabel 5. Tingkat Kematangan Gonad Secara Morfologi di Perairan Ngemboh:

TKG	Jantan	Betina
III	Gonad menjadi lunak dan terlihat jelas. Gonad berwarna krem kekuningan.	-
IV	Kematangan seksual telah tercapai. Sebaian besar folikel kosong.	Kematangan seksual telah tercapai. Sebaian besar folikel kosong.

Berdasarkan data yang diperoleh ukuran cangkang kerang hijau pada setiap stasiun berbeda-beda. Ukuran cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) di ketiga stasiun dari terkecil ke terbesar secara berturut-turut adalah perairan Kaligung Pasuruan (3,27 cm -3,86 cm), perairan Nguling Pasuruan (4,03 cm -5,55 cm) dan perairan Ngemboh Gresik (5,21 cm -6,41cm). Ukuran cangkang kerang berhubungan dengan akumulasi logam berat di dalam perairan (Fauziah *et al.*, 2012). Pada rentang ukuran kecil (2-4 cm) dan besar (6-8 cm) penambahan ukuran morfometri tidak mempengaruhi penyerapan dan akumulasi logam berat. Sedangkan pada rentang ukuran yang sedang (4-6 cm) penambahan ukuran morfometri seiring dengan penambahan akumulasi logam berat. Akumulasi tributiltin pada kerang dapat menyebabkan kerusakan DNA dan mengganggu kerja endokrin. Tributiltin yang tinggi dapat menyebabkan kecacatan pada cangkang kerang (Yaqin *et al.*, 2014).

TKG pada kerang hijau jantan dan betina yang diperoleh pada setiap stasiun berbeda-beda. Tingkat kematangan gonad dan morfologi kerang hijau dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Morfologi dan Tingkat Kematangan Gonad Kerang Hijau Seluruh Stasiun

No	Perairan	r	Berat tubuh (gr)		Panjang tubuh (cm)		Berat gonad (gr)		TKG	
			J	B	J	B	J	B	J	B
1	Kaligung	1	2,99	2,87	3,48	3,42	0,06	0,05	II	IV
		2	2,51	3,73	3,27	3,67	0,07	0,1	II	III
		3	3,66	3,49	3,62	3,86	0,08	0,07	II	IV
2	Nguling	1	5,39	4,91	4,49	4,42	0,08	0,06	III	IV
		2	4,25	4,65	4,41	4,57	0,06	0,07	III	IV
		3	3,81	7,88	4,03	5,55	0,07	0,07	III	IV
3	Ngemboh	1	17,82	11,75	6,31	5,86	0,4	0,13	IV	IV
		2	12,84	12,18	5,87	5,68	0,23	0,15	III	IV
		3	10,22	15,72	5,21	6,41	0,19	0,15	IV	IV

TKG jantan pada perairan Kaligung diperoleh TKG pada tahap II dan pada betina TKG III dan IV. Perairan Nguling diperoleh TKG pada jantan adalah TKG III dan pada betina TKG IV. Perairan Ngemboh diperoleh TKG pada jantan adalah TKG III dan IV sedangkan pada betina TKG IV. Perkembangan TKG dipengaruhi oleh faktor kualitas air dan nutrisi dari pakan (Widasari *et al.*, 2013). Pakan yang dapat mempengaruhi vitelogenesis adalah pakan yang mengandung protein, lemak, vitamin E, vitamin C dan mineral yang sesuai dengan kebutuhan organisme sebagai bahan pembentuk vitelogenin. Protein merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan dalam proses reproduksi terutama saat pematangan gonad. Pakan yang tidak optimal menyebabkan kurangnya energi untuk mendukung proses reproduksi, terutama dalam mensintesis hormone yang terlibat dalam perkembangan telur seperti estradiol 17β (Sinjal *et al.*, 2014). Selain itu, hormon juga mempengaruhi perkembangan TKG. Salah satunya adalah hormon estrogen. Kadar estrogen yang tinggi di dalam lapisan granulosa akan meningkatkan kinerja hati untuk mensintesis vitelogenin (Dewantoro, 2015; Harvey dan Hoar, 1979; Nagahama *et al.* 1983).

Estrogen merupakan hormon yang terdapat di dalam tubuh organisme dan memiliki reseptor khusus untuk sistem kerjanya yaitu estrogen reseptor. Estrogen reseptor hanya dapat berikatan dengan estrogen atau zat yang menyerupai estrogen (*xenoestrogen*). Pembentukan estrogen dimulai dari adanya stimulasi dari lingkungan dan diteruskan ke hipotalamus dengan mengaktifkan reseptor dan masuk ke dalam organ target. Vitelogenin merupakan bakal kuning telur yang proses produksinya di hati kemudian ditransportasikan ke indung telur dan disimpan ke dalam telur sehingga telur akan membesar. Estrogen merangsang sintesis vitelogenin di dalam hati dan sekresi vitelogenin dalam oosit. (Truscott *et al.*, 1986).

4.3. Ekspresi *Estrogen Receptor* (ER) pada Gonad Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Pengamatan ekspresi *estrogen receptor* pada tahap imunohistokimia menggunakan metode langsung (*direct method*) yaitu menggunakan antibodi primer yang sudah terlabel. Pewarnaan yang dilakukan adalah pewarnaan *double staining* yaitu pewarnaan dengan menggunakan dua macam antibodi sekaligus. Adapun antibodi yang digunakan adalah antibodi estradiol (E2) terlabel *Flourescein Isothiocyanate* (FITC) yang menunjukkan pendaran warna hijau pada gambar yang terekspresi dan antibodi *estrogen receptor alfa* terlabel *Tetramethylrhodamine* (TRITC) yang menunjukkan pendaran warna merah pada gambar yang terekspresi.

Antibodi merupakan protein yang dapat mengenali dan mengikat antigen tertentu. Antigen merupakan molekul (protein) asing yang memacu pembentukan antibodi (Aryulina *et al.*, 2006). Cara umum untuk menghasilkan antibodi adalah dengan menyuntikkan sedikit antigen pada tikus atau kelinci. Tubuh kelinci atau tikus akan merespon antigen dengan menghasilkan antibodi yang secara tidak langsung dapat diambil dari darahnya. Akan tetapi biasanya antigen direspon oleh beberapa macam sel. Antibodi yang dihasilkan adalah antibodi poliklonal yaitu antibodi yang dihasilkan oleh berbagai sel (Firmansyah *et al.* 2007).

Setelah dilakukan pewarnaan, spesimen gonad kerang hijau (*Perna viridis*) diamati dengan *Confocal Laser Scanning Microskopy* (CLSM). Terdapat 3 lokasi pengambilan sampel kerang hijau pada penelitian yaitu perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik. Masing-masing lokasi penelitian diambil sampel kerang hijau sebanyak 6 yang terdiri dari 3 sampel jantan dan 3 betina. Setiap spesimen yang diamati terdapat 5 gambar yang ditampilkan yaitu gambar dengan E2 FITC, ER TRITC, *Super Impose* (SI),

Differential Interference Contrasts (DIC) dan gambar gabungan E2 FITC dan ER TRITC. Gambar *Differential Interference Contrasts* (DIC) menampilkan gambar 3 dimensi berwarna hitam putih yang jelas. *Super Impose* (SI) menampilkan gambar gabungan dari E2 FITC, ER TRITC dan *Differential Interference Contrasts* (DIC) sehingga tampak lokalisasi ekspresi *estrogen receptor* yang tersebar pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*). Hasil pencitraan gonad kerang hijau jantan dan betina dapat dilihat pada lampiran 4.

Spesimen target kemudian diambil gambar gabungan fluoresensi E2 FITC dan ER TRITC untuk mendapatkan grafik 3 dimensi. Berdasarkan grafik yang diperoleh dapat diketahui nilai kuantitatif intensitas fluoresensi yang dapat dirubah menjadi file excel. Data grafik yang diubah dalam file excel akan diperoleh data rata-rata intensitas ekspresi *estrogen receptor* pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) yang akurat dan mudah untuk diidentifikasi. Adapun data tersebut dapat dilihat pada lampiran 3.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat dilihat adanya pendaran warna merah (ER TRITC) pada preparat gonad kerang hijau (*Perna viridis*) betina di ketiga stasiun pengamatan yaitu perairan Kaligung Pasuruan, Perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik yang telah diberi antibodi primer terlabel. Pendaran warna merah menunjukkan protein estrogen reseptor terekspresi. Bagian yang gelap atau tidak terang menandakan bahwa pada bagian tersebut tidak ada estrogen reseptor yang terekspresi. Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat bahwa pendaran warna paling terang berturut-turut adalah pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) betina perairan Ngemboh Gresik, perairan Nguling pasuruan dan perairan Kaligung Pasuruan.

Gambar intensitas E2 FITC dan ER TRITC yang terekspresi menghasilkan sebuah grafik 3 dimensi. Grafik 3 dimensi tersebut terdapat 3 warna yaitu warna

biru, hijau dan kuning. Warna-warna tersebut menunjukkan intensitas *fluoresensi*. Warna biru menunjukkan intensitas yang rendah, warna hijau menunjukkan intensitas sedang dan warna kuning menunjukkan intensitas tinggi. Grafik 3 dimensi dan gambar intensitas ekspresi ER dari hasil *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) dapat dilihat pada lampiran 4.

4.4 Data Intensitas Fluoresensi

Intensitas estrogen reseptor didapatkan dengan menggunakan program *Region Measurement* berdasarkan intensitas pewarnaan relatif pada suatu titik. Pada setiap preparat diambil 2 titik yang mewakili pendaran cahaya fluoresensi (pendaran yang paling terang). Data yang diperoleh dari masing-masing titik fluoresensi dapat dilihat pada Lampiran 3.

a. Perairan Kaligung Pasuruan

Berdasarkan tabel 7 dapat dilihat bahwa intensitas ekspresi estrogen reseptor pada perairan Kaligung Pasuruan pada kerang hijau (*Perna viridis*) jantan yang memiliki nilai intensitas ekspresi ER rata-rata tertinggi adalah pada S1J1 sebesar 186,41 intensity/ μm dan nilai intensitas ekspresi ER rata-rata terendah pada S1J2 sebesar 121,94 intensity/ μm . Sedangkan nilai intensitas ekspresi estrogen reseptor pada perairan Kaligung Pasuruan pada kerang hijau (*Perna viridis*) betina yang memiliki nilai intensitas ekspresi ER rata-rata tertinggi adalah pada S1B2 sebesar 287,46 intensity/ μm dan nilai intensitas ekspresi ER rata-rata terendah pada S1J3 sebesar 186,34 intensity/ μm .

Tabel 7. Data rata-rata Intensitas ekspresi ER di perairan Kaligung Pasuruan

Perairan	Jenis kelamin	Ulangan	Ekspresi Estrogen Reseptor	Rata-rata	
Stasiun 1 (Kaligung)	Jantan	1 (S1J1)	A	180,21	186,41
			B	192,60	
		2 (S1J2)	A	141,61	121,94
			B	102,27	
		3	A	198,33	

Lanjutan tabel 7.

		(S1J3)	B	102,87	150,60
	Rata-rata				152,98
	StdDev				32,70
Betina	1 (S1B1)	A		209,09	199,83
		B		190,56	
	2 (S1B2)	A		326,03	287,46
		B		248,89	
	3 (S1B3)	A		203,62	186,34
		B		169,06	
	Rata-rata				224,54
	stdDev				31,30

b. Perairan Nguling Pasuruan

Berdasarkan tabel 8 dapat dilihat bahwa intensitas ekspresi estrogen reseptor pada perairan Nguling Pasuruan pada kerang hijau (*Perna viridis*) jantan yang memiliki nilai intensitas ekspresi ER rata-rata tertinggi adalah pada S2J2 sebesar 130,45 intency/ μm dan nilai intensitas ekspresi ER rata-rata terendah pada S2J1 sebesar 80,52 intency/ μm . Sedangkan nilai intensitas ekspresi estrogen reseptor pada perairan Nguling Pasuruan pada kerang hijau (*Perna viridis*) betina yang memiliki nilai intensitas ekspresi ER rata-rata tertinggi adalah pada S2B1 sebesar 302,62 intency/ μm dan nilai intensitas ekspresi ER rata-rata terendah pada S2B3 sebesar 226,91 intency/ μm .

Tabel 8. Data rata-rata Intensitas ekspresi ER di perairan Nguling Pasuruan

Perlakuan	Jenis kelamin	Ulangan	Ekspresi Estrogen Reseptor		Rata-rata	
stasiun 2 (Nguling)	Jantan	1 (S2J1)	A	81,13	80,52	
			B	79,90		
		2 (S2J2)	A	136,50	130,45	
			B	124,39		
		3 (S2J3)	A	109,85	122,40	
			B	134,95		
	Rata-rata				111,12	
	StdDev				26,81	
		Betina	1(S2B1)	A	300,42	

Lanjutan tabel 8.

stasiun 2 (Nguling)	Betina	2(S2B2)	B	304,82	302,62
			A	323,46	296,35
			B	269,24	
		3(S2B3)	A	193,93	226,91
			B	259,90	
		Rata-rata			
stdDev				42,02	

c. Perairan Ngembah Gresik

Berdasarkan tabel 9 dapat dilihat bahwa intensitas ekspresi estrogen reseptor pada perairan Ngembah Gresik pada kerang hijau (*Perna viridis*) jantan yang memiliki nilai intensitas ekspresi ER rata-rata tertinggi adalah pada S3J2 sebesar 162,85 intensity/ μm dan nilai intensitas ekspresi ER rata-rata terendah pada S3J1 sebesar 118,27 intensity/ μm . Sedangkan nilai intensitas ekspresi estrogen reseptor pada perairan Ngembah Gresik pada kerang hijau (*Perna viridis*) betina yang memiliki nilai intensitas ekspresi ER rata-rata tertinggi adalah pada S3B1 sebesar 303,44 intensity/ μm dan nilai intensitas rata-rata ekspresi ER terendah pada S3B3 sebesar 239,18 intensity/ μm .

Tabel 9. Data rata-rata Intensitas ekspresi ER di perairan Ngembah Gresik

Perlakuan	Jenis kelamin	Ulangan	Ekspresi Estrogen Reseptor		Rata-rata	
Stasiun 3 (Ngembah)	Jantan	1 (S3J1)	A	113,21	118,27	
			B	123,33		
		2 (S3J2)	A	179,19	162,85	
			B	146,52		
		3 (S3J3)	A	139,08	127,30	
			B	115,52		
	Rata-rata				136,14	
	StdDev				23,57	
	Betina	1 (S3B1)	A	297,21	303,44	
			B	309,67		
2 (S3B2)		A	369,91	286,05		
		B	202,20			

Lanjutan tabel 9.

	3 (S3B3)	A	219,85	239,18
		B	258,51	
Rata-rata				276,23
stdDev				33,24

Ekspresi estrogen reseptor terdeteksi pada jaringan gonad kerang hijau (*Perna viridis*). Hal ini sesuai dengan pendapat Nagaswa *et al.* (2015), bahwa estrogen reseptor banyak ditemukan pada organ gonad dan insang. Estrogen reseptor yang ada didalam gonad akan segera memberikan sinyal dalam sistem reproduksi bivalvia. Estrogen reseptor akan dialokasikan dalam sel folikel pada betina dan dalam sel sertoli pada jantan melalui nutrisi yang disalurkan ke gamet yang sedang berkembang.

Berdasarkan tabel 10 rata-rata nilai Intensitas ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) jantan dan betina yang ditemukan pada seluruh stasiun pengamatan dapat diketahui bahwa rata-rata nilai intensitas ekspresi estrogen reseptor tertinggi pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) jantan adalah pada perairan Kaligung Pasuruan sebesar 152,98 intencity/ μm . Hal ini dikarenakan tingkat kematangan gonad kerang hijau jantan pada perairan kaligung masih dalam tahap *pramaturity* yaitu pada TKG tingkat II. Hal ini sesuai dengan pendapat Ciocan *et al.* (2010) bahwa pada kerang jantan lebih rentan terhadap *xenoestrogen* daripada perempuan pada tahap perkembangan gonad.

Sedangkan rata-rata nilai intensitas ekspresi estrogen reseptor tertinggi pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) betina adalah pada perairan Ngemboh Gresik sebesar 276,22 intencity/ μm . Hal ini dikarenakan pada perairan tersebut didominasi oleh kegiatan industri-industri besar dan kegiatan perikanan sehingga ada banyak sumber masukan limbah yang masuk kedalam perairan. Perairan yang terkontaminasi limbah akan menyebabkan kacaunya ikatan estrogen

reseptor terhadap hormon (Ciocan *et al.*, 2010). Reseptor estrogen yang akan mengekspresikan hormon estrogen dapat diaktifkan oleh senyawa estrogenik (Juanda, 2013).

4.4.1 Perbandingan Ekspresi Estrogen Reseptor Pada Ketiga Lokasi

Berdasarkan hasil analisis ekspresi estrogen reseptor diperoleh hasil rata-rata ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau jantan dan betina di perairan Kaligung berturut-turut sebesar 152,98 intensity/ μm dan 224,54 intensity/ μm . Rata-rata ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau jantan dan betina di perairan Nguling berturut-turut sebesar 111,12 intensity/ μm dan 275,29 intensity/ μm , sedangkan Rata-rata ekspresi estrogen reseptor di perairan Ngemboh pada kerang hijau jantan sebesar 136,14 intensity/ μm dan 276,22 intensity/ μm pada betina.

Tabel 10. Data hasil analisis rata-rata Intensitas ekspresi estrogen reseptor Seluruh Stasiun Pengamatan

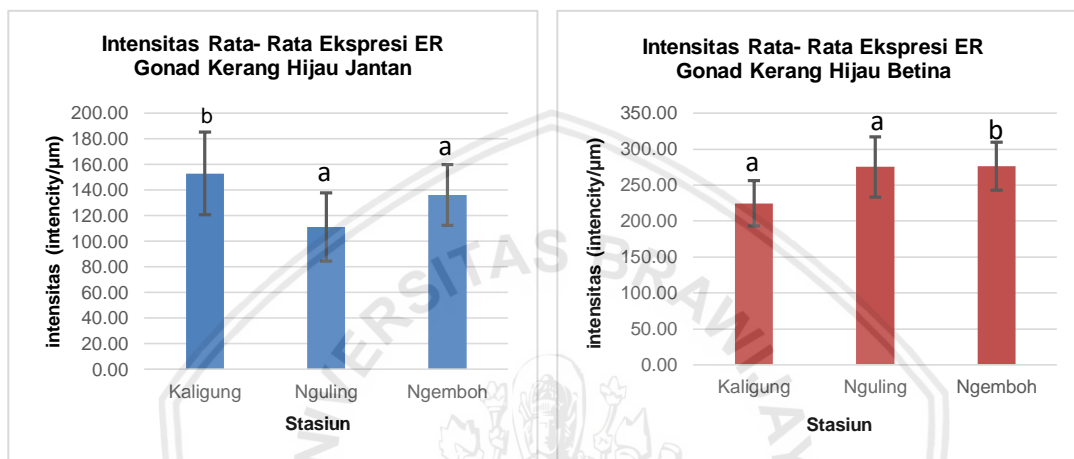
Rata-rata intensitas ekspresi <i>estrogen receptor</i> (intensity/ μm)			
JANTAN			
Ulangan	Stasiun		
	Kaligung	Nguling	Ngemboh
1	186,41	80,52	118,27
2	121,94	130,45	162,85
3	150,60	122,40	127,30
TOTAL	458,95	333,37	408,42
RATA-RATA	152,98	111,12	136,14
stdDev	32,30	26,81	23,57
BETINA			
Ulangan	Stasiun		
	Kaligung	Nguling	Ngemboh
1	199,83	302,62	303,44
2	287,46	296,35	286,05
3	186,34	226,91	239,18
TOTAL	673,63	825,88	828,67
RATA-RATA	224,54	275,29	276,22
stdDev	31,70	42,02	33,24

Rata-rata nilai intensitas gonad kerang hijau (*Perna viridis*) jantan dan betina yang ditemukan di perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik ditunjukkan pada gambar 14 dan 15.

Perairan Nguling merupakan perairan yang paling bersih sehingga dapat dijadikan sebagai kontrol. Berdasarkan grafik dibawah dapat dilihat bahwa nilai ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau jantan diperairan Kaligung dan Ngemboh lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekspresi estrogen reseptor pada perairan Nguling. Kisaran ekspresi estrogen reseptor pada kerang hijau jantan diperairan kontrol yaitu 80,52 intensity/ μm - 130,45 intensity/ μm . Estrogen reseptor yang tinggi di dalam gonad jantan dapat menyebabkan terjadinya feminisasi dan menurunkan kualitas sperma. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ciocian *et al.* (2010) bahwa kadar estrogen reseptor yang tinggi akan menyebabkan semakin cepatnya proses kerusakan pada sistem endokrin. Salah satunya adalah terjadinya feminisasi. Feminisasi adalah berubahnya jenis kelamin jantan ke betina. Hal ini dikarenakan adanya paparan senyawa estrogenik di dalam perairan sehingga dapat menyebabkan kacaunya ikatan estrogen terhadap hormon.

Ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau betina diperairan Kaligung lebih rendah dibandingkan perairan Nguling dan ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau betina diperairan Ngemboh lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekspresi estrogen reseptor pada perairan Nguling. Kisaran ekspresi estrogen reseptor pada kerang hijau betina diperairan kontrol yaitu 226,91 intensity/ μm - 302,62 intensity/ μm . Estrogen reseptor yang tinggi di dalam gonad betina dapat mengakibatkan kerusakan pada gonad. Hal ini dikarenakan estrogen reseptor akan terikat dengan senyawa estrogenik sehingga sistem endokrin akan terganggu (Milla *et al.*, 2011). Sedangkan estrogen reseptor yang

rendah di dalam gonad betina dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan pada gonad. Hormon estrogen tidak dapat terekspresi bila tidak ada estrogen reseptor karena estrogen reseptor berfungsi sebagai perantara terekspresinya hormon estrogen di dalam gonad (Lubahn *et al.*, 1993, Davis *et al.*, 2008, Ni *et al.*, 2013).



Gambar 8. Rata-rata intensitas ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) jantan pada perairan Kaligung Pasuruan 152,98 intencity/μm, perairan Nguling Pasuruan 111,12 intencity/μm dan perairan Ngemboh Gresik 136,14 intencity/μm.

Gambar 9. Rata-rata intensitas ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) betina pada perairan Kaligung Pasuruan 224,54 intencity/μm, perairan Nguling Pasuruan 275,29 intencity/μm dan perairan Ngemboh Gresik 276,22 intencity/μm.

Hasil analisa data menggunakan ANOVA *one –way* dengan tingkat kepercayaan 95% pada ekspresi estrogen kerang hijau jantan maupun betina menunjukkan nilai (sig.> 0,05) yaitu (0,26>0,05) pada jantan dan (0,33>0,05) pada betina sehingga varian data pada seluruh stasiun tidak berbeda secara nyata. Dikarenakan hasil sig> 0,05 dan tidak berbeda nyata maka tidak diperlukan uji lanjut BNT. Hasil analisa ANOVA *One –Way* menggunakan aplikasi SPSS versi 16.0 dapat dilihat pada lampiran 3.

Kedua grafik diatas menunjukkan nilai rata-rata intensitas ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau (*Perna viridis*) betina lebih tinggi dibandingkan gonad kerang hijau (*Perna viridis*) jantan yang ada di perairan Kaligung, Nguling

maupun Ngemboh. Hal ini dikarenakan ekspresi estrogen reseptor merupakan reseptor pengikat hormon estrogen yang banyak dimiliki oleh hewan betina, sehingga secara tidak langsung estrogen reseptor betina lebih tinggi dari pada jantan. Cheng *et al.* (2015) menyatakan bahwa adanya estrogen reseptor di dalam tubuh dipengaruhi dengan aksi estradiol yang ada di dalam tubuh organisme tersebut. Hormon estrogen merupakan hormon reproduksi pada hewan betina. Hormon estrogen disekresi oleh sel-sel granulosa penyusun folikel ovarium. Hormon estrogen dalam tubuh betina berupa estradiol 17- β , estron dan estriol, namun yang paling dominan adalah estradiol 17- β (Sitasiwi, 2008). Sekresi testis dan ekstra gonad pada jantan secara langsung tidak terdapat estriol, estron dan estradiol 17- β , tapi yang terdapat pada testis dan gonad yang terlebih dahulu adalah androgen. Sehingga estrogen reseptor pada gonad betina lebih tinggi dibandingkan dengan gonad jantan (Eertmans *et al.*, 2003).

4.5 Hasil Pengukuran Kualitas Air Pendukung

Parameter kualitas air yang diukur selama penelitian di perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik meliputi suhu, pH, DO dan salinitas. Hasil pengukuran kualitas air yang dilakukan selama penelitian dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Data kualitas air di perairan Kaligung Pasuruan, perairan Nguling Pasuruan dan perairan Ngemboh Gresik

Lokasi	Suhu (°C)	pH	DO (ppm)	Salinitas (ppt)
Perairan Kaligung Pasuruan	34.2	9	7.5	35
Perairan Nguling Pasuruan	32.6	8	7.0	35
Perairan Ngemboh Gresik	32.1	8.9	5.7	30
KEPMEN LH No. 51 Th 2004	28-30	7-8.5	>5	30-34

4.5.1 Parameter Fisika

a. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor abiotik yang sangat menentukan kelangsungan hidup organisme perairan. Peningkatan suhu dapat menurunkan kadar oksigen terlarut di dalam dalam perairan sehingga mempengaruhi metabolisme seperti laju pernafasan dan konsumsi oksigen serta meningkatnya konsentrasi karbon dioksida (Affan, 2012). Suhu optimum untuk jenis kerang-kerangan pada daerah tropis adalah 20-35°C dengan fluktuasi tidak lebih dari 5 °C (Supriyantini dan Endrawati, 2015). Peningkatan suhu sebesar 10 °C dapat menyebabkan peningkatan konsumsi oksigen sehingga oksigen terlarut didalam perairan akan menurun. Hal ini dikarenakan tingginya aktifitas metabolisme dan respirasi organisme di dalam perairan apabila suhu di perairan meningkat (Effendi, 2003). Suhu dapat mempengaruhi kadar EDCs di dalam perairan. Hal ini sesuai dengan penelitian Pojana *et al.* (2007) bahwa pada suhu dibawah 20°C nilai EDCs lebih tinggi dibandingkan pada suhu diatas 20°C. EDCs dapat mempengaruhi proses hemostatis pada kerang (Cancsi *et al.*, 2007). Paparan EE2 mempercepat metangnya gonad pada ikan tetapi pada kondisi suhu yang tinggi paparan EE2 menyebabkan keterlambatan dalam perkembangan gonad jantan (Luzio *et al.*, 2016).

Hasil pengukuran suhu pada penelitian ini diperoleh pada kisaran 32.1 °C - 34.2°C. Nilai suhu yang diperoleh pada seluruh stasiun lebih besar dari kisaran baku mutu kualitas air untuk biota laut menurut Keputusan Menteri No. 51 Tahun 2004 dimana nilai optimum suhu berkisar antara 28 °C -30°C. Tingginya suhu perairan saat pengamatan disebabkan karena intensitas cahaya matahari yang sangat tinggi tetapi suhu perairan masih dapat ditoleransi oleh kerang hijau. Supriyantini dan Endrawati (2015) menyatakan bahwa suhu optimum untuk kerang-kerangan adalah berkisara antara 20 °C -35°C dengan fluktuasi tidak lebih

dari 5°C. Hal ini menunjukkan bahwa kisaran suhu di perairan Kaligung, perairan Nguling dan perairan Ngemboh masih baik untuk pertumbuhan hidup kerang hijau (*Perna viridis*).

4.5.2 Parameter Kimia

a. pH

Hasil pengukuran pH pada penelitian ini diperoleh pada kisaran 8-9. Perairan Kaligung diperoleh sebesar 9, perairan Nguling sebesar 8 dan perairan Ngemboh sebesar 8.9. Berdasarkan data hasil pengukuran pH dapat diketahui bahwa nilai pH pada stasiun Nguling masih dalam kisaran baku mutu kualitas air untuk biota laut menurut Keputusan Menteri No. 51 Tahun 2004 dimana nilai optimum pH berkisar antara 7-8.5. Sedangkan nilai pH pada stasiun Kaligung dan Ngemboh melebihi dari standar baku mutu kualitas air untuk biota laut menurut Keputusan Menteri No. 51 Tahun 2004. Sreedevi *et al.* (2014) menyatakan bahwa kerang hijau dapat mentoleransi pH pada kisaran 7-9. Daerah Kaligung dan Ngemboh merupakan daerah yang padat penduduk sehingga limbah yang masuk ke dalam perairan dapat meningkatkan pH perairan contohnya adalah limbah detergen yang memiliki pH yang tinggi. Suyatno *et al.* (2007) menyatakan bahwa nilai pH dalam suatu perairan merupakan indikasi terjadinya pencemaran pada perairan tersebut.

pH merupakan faktor penting dalam mengendalikan EDCs seperti BPA pada perairan. BPA merupakan zat kimia endokrin (EDC) yang ada di perairan dan dapat berdampak buruk terhadap lingkungan dan kesehatan karena dapat meniru aksi estrogen dan mengganggu fungsi hormon. Konsentrasi BPA tertinggi pada pH 8, sedikit meningkat pada pH 6-8 dan menurun secara signifikan pada pH 10. Hal ini dikarenakan adanya proses penguraian BPA (Borrirukwisitsak *et al.*, 2012).

b. DO

Hasil pengukuran oksigen terlarut pada penelitian ini diperoleh pada kisaran 5.7 -7.5 ppm. Berdasarkan data hasil pengukuran oksigen terlarut dapat diketahui bahwa nilai oksigen terlarut pada seluruh stasiun berada di atas kisaran baku mutu kualitas air untuk biota laut menurut Keputusan Menteri No. 51 Tahun 2004 dimana nilai optimum oksigen terlarut >5 ppm sehingga masih aman untuk kelangsungan hidup kerang hijau. Mentari *et al.* (2017) menyatakan bahwa kadar oksigen perairan yang optimal untuk kelangsungan hidup kerang adalah berkisar antara 4.5-6.5 mg/l. Kadar oksigen yang rendah mempengaruhi lambatnya pertumbuhan bahkan kematian organisme. Effendi (2003) menyatakan bahwa suhu, turbulensi air, salinitas dan tekanan atmosfer dapat mempengaruhi oksigen terlarut didalam suatu perairan. Terjadinya fluktuasi kadar oksigen terlarut dipengaruhi oleh proses pencampuran, pergerakan massa air, aktivitas fotosintesis, respirasi dan adanya masukan limbah yang masuk ke dalam perairan. Oksigen terlarut yang rendah dapat mempengaruhi pertumbuhan, perkembangan dan perbandingan RNA/DNA, pembentukan gonad dan embrio (Halem *et al.*, 2014; hassell *et al.*, 2008; wang *et al.*, 2008).

c. Salinitas

Hasil pengukuran salinitas pada penelitian ini diperoleh pada kisaran 30-35 ppt. Berdasarkan data hasil pengukuran salinitas dapat diketahui bahwa salinitas pada perairan Ngemboh masih dalam kisaran baku mutu kualitas air untuk biota laut menurut Keputusan Menteri No. 51 Tahun 2004 dimana nilai optimum salinitas berkisar antara 30-34 ppt. Sedangkan nilai salinitas pada stasiun Kaligung dan Ngemboh melebihi dari standar baku mutu kualitas air untuk biota laut menurut Keputusan Menteri No. 51 Tahun 2004. McGuire dan Stevely (2009) menyatakan bahwa nilai salinitas pada kisaran 15-45 ppt kerang hijau masih mampu bertahan

hidup. Salinitas yang tinggi dapat meningkatkan laju filtrasi pada tubuh kerang hijau.

Salinitas merupakan faktor ekologi yang dapat mempengaruhi distribusi, kelimpahan dan fisiologi organisme air. Apabila nilai salinitas di dalam suatu perairan turun maka kerang hijau akan mengalami stres osmotik sehingga produksi busur berkurang karena kerang hijau membutuhkan energi lebih untuk osmoregulasi (Temmy *et al.*, 2017). Isnaeni (2006) menyatakan bahwa keseimbangan antara kandungan ion cairan tubuh dengan ion di lingkungan dapat mempengaruhi kelangsungan hidup organisme hal ini disebut dengan osmoregulasi. Apabila selisih osmotik ion yang ada di dalam tubuh dan yang ada di lingkungan terlalu tinggi maka akan menyebabkan proses fisiologis terganggu, organisme akan stres dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Salinitas merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efek EDCs pada reproduksi ikan. Ikan akan merespon kontaminan estrogenik dan androgenik yang lebih rendah pada air tawar dan akan merespon lebih tinggi pada air yang salinitasnya lebih tinggi (Bosker *et al.*, 2017; Rhee *et al.*, 2010; Borrirukwisitsak *et al.*, 2012). Salinitas yang tinggi akan mengakibatkan bioakumulasi EDCs tinggi dalam lipid organisme akuatik dan EDCs akan bertahan lama di lingkungan karena adsorpsi yang lebih besar ke dalam sadimen. Bioakumulasi EDCs pada organisme laut lebih tinggi daripada organisme air tawar (Borrirukwisitsak *et al.*, 2012).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau jantan diperairan Kaligung dan Ngemboh lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresi estrogen reseptor pada perairan Nguling yaitu 186,41 intencity/ μm dan 162,85 intencity/ μm . Kisaran ekspresi estrogen reseptor pada kerang hijau jantan diperairan Nguling yaitu 80,52 intencity/ μm - 130,45 intencity/ μm .

Ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau betina diperairan Kaligung lebih rendah dibandingkan perairan Nguling yaitu sebesar 199,83 intencity/ μm dan ekspresi estrogen reseptor pada gonad kerang hijau betina diperairan Ngemboh lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekspresi estrogen reseptor pada perairan Nguling yaitu sebesar 303,44 intencity/ μm . Kisaran ekspresi estrogen reseptor pada kerang hijau betina diperairan Nguling yaitu 226,91 intencity/ μm - 302,62 intencity/ μm .

Diketahui pada saat penelitian telah terjadi keabnormalan pada gonad kerang hijau jantan di perairan Kaligung Pasuruan, gonad kerang hijau betina di perairan Kaligung dan gonad kerang hijau betina di Ngemboh. Analisa data secara statistik dilakukan dengan ANOVA *one way* dan menunjukkan hasil tidak adanya perbedaan nyata kadar estrogen reseptor pada gonad kerang hijau jantan dan betina di perairan Kaligung, Nguling dan Ngemboh.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan untuk mencegah terjadinya keabnormalan pada gonad jantan dan betina kerang hijau yaitu diperlukan peningkatan kondisi perairan dengan cara tidak membuang

sampah sembarangan ke dalam perairan karena dapat mengganggu kehidupan organisme yang ada di perairan tersebut.



DAFTAR PUSTAKA

- Adani, N. G., M. R. Muskanonfola dan I. B. Hendrarto. 2013. Kesuburan Perairan Ditinjau Dari Kandungan Klorofil-a Fitoplankton Studi Kasus Di Sungai Wedug, Demak. *Diponegoro Journal of Maquares*. **2**(4): 38-45.
- Affan, J. M. 2012. Identifikasi Lokasi Untuk Pengembangan Budidaya Keramba Jaring Apung (KJA) Berdasarkan Faktor Lingkungan dan Kualitas Air Di Perairan Pantai Timur Bangka Tengah. *Jurnal Depik*. **1**(1): 78-85.
- Akbar, J., Bakhtiar dan E. Ishak. 2014. Studi Morfometrik Kerang Kalandue (*Polymesoda erosa*) di Hutan Mangrove Taluk Kendari. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. **4**(1): 1-12.
- Alifia, F. 2011. Respon Timulin Pada Hati Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Froskall) Yang Tercemar Logam Timbal (Pb). *Jurnal Balik Diwa*. **2**(1): 8-17.
- Arman, E. dan S. Supriyanti. 2007. Struktur Komunitas Perifiton Pada Substrat Kaca Dilokasi Pemeliharaan Kerang Hijau (*Perna viridis*) Di Perairan Teluk Jakarta. *Jurnal Hidrosfir*. **1**(2): 67-74.
- Aryulina, D., C. Muslim, S. Manaf dan E W. Winarni. 2006. *Biologi 2*. Esis. Hal 1-350.
- Badan Pusat Statistik. 2017. *Kecamatan Ujungpangkah Dalam Angka 2017*. Hal 1-65.
- Badan Pusat Statistik. 2018. *Kecamatan Keraton Dalam Angka 2018*. Hal 1-92.
- Badan Pusat Statistik. 2018. *Kecamatan Nguling Dalam Angka 2018*. Hal 1-102.
- Bannister, R. N. Beresford, D.W. Granger, N. A. Pounds, M. Routledge-Weaver, R. White and E. J. Routledge. 2013. No Substantial Changes In Estrogen Receptor And Estrogen-Related Receptor Orthologue Gene Transcription In *Marisa cornuarietis* Esposed To Estrogenic Chemicals. *Aquatic Toxicology*. **140-141**. 19-26.
- Batubara, H. 2013. Penentuan Harga Pokok Produksi Berdasarkan Metode *Full Costing* Pada Pembuatan Etalase Kaca dan Alumunium di UD. Istana Alumunium Manado. *Jurnal Riset Ekonomi, Manajemen, Bisnis Dan Akuntansi*. **1**(3): 217-224.
- Borrirukwistitsak, S., H. E. Keenan and C. Gauchotte-Lindsay. 2012. Effects of Salinity, pH And Temperature on The Octanol- Water Partition Coefficient of Bisphenol A. *International Journal of Environmental Science and Development*. **3**(5): 460-464.
- Bosker, T., G. Santoro and S. Melvin. 2017. Salinity and Sensitivity to Endocrine Disrupting Chemicals: A Comparison of Reproductive Endpoints In Small-Bodied Fish Exposed Under Different Salinities. *Chemosphere*. **183**. 186-196.

- Cancsi, L., L. C. L. Russo, C. Ciacci, M. Betti, M. Rocchi, G. Poiana and A. Macromini. 2007. Immunomodulation of *Mytilus* Hemocytes by Individual Estrogenic Chemicals and Environmentally Relevant Mixtures of Estrogens: in Vitro and in Vivo Studies. *Aqua Toxicol.* **81**. 36-44.
- Cappenberg, H. A. W. 2008. Beberapa Aspek Biologi Kerang Hijau *Perna viridis* Linnaeus 1758. *Oseana*. **33**(1) : 33-40.
- Cheng, Y. Y., W. J. Tao, J. L. Chen, L. N. Sun, L. Y. Zhou, Q. Song and D. S. Wang. 2015. Genome-Wide Identification, Evolution and Expression Analysis of Nuclear Receptor Superfamily In Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gene*. **569**(1): 141-152.
- Ciocan, C. M., E. Cubero –Leon, A. M. Puinean, E. M. Hill, C. Minier, M. Osada, K. Fenlon and J. M. Rotchell. 2010. Effect of Estrogen Exposure in Mussels, *Mytilus edulis*, at Different Stage of Gametogenesis. *Environmental Pollution*. **158**(9): 2977-2984.
- Cody. 2001. *Environmental Estrogen-Global Problem*. Healthcare In Motion Magazine. Berkeley. California.
- Davis, L. K., A. L. Pierce., N. Hiramatsu., C. V. Sullivan., T. Hirano and E. G. Grau. 2008. Gender-Specific Expression of Multiple Estrogen Receptors, Growth Hormone Receptors, Insulin-Like Growth Factors and Vitellogenin and Effects of 17 β -Estradiol In The Male Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*. **156** (3): 554-551.
- Dewantoro, E. 2015. Keragaan Gonad Ikan Tengadak (*Barbonymus schwanenfeldii*) Setelah Diinjeksi Hormon HCG Secara Berkala. *Jurnal Akuantika*. **6**(1): 1-10.
- Dewi, M. 2016. Kinerja UPTD dalam Pengelolaan Objek Wisata Candi Muara Takus Kecamatan XIII Koto Kampar Kabupaten Kampar. *Jurnal Online Mahasiswa FISIP*. **3**(2): 1-16.
- Diamanti-Kandarakis, E., B. Jean-Pierre, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller and A. C. Gore. 2009. Endocrine- Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*. **30**(4): 293-342.
- Eertmans, F., W. Dhoonge, S. Stuyvaert and F. Comhaire. 2003. Endocrine Disruptors: Effects on Male Fertility and Screening Tools for Their Assessment. *Toxicology in Vitro*. **17**(5-6): 515-524.
- Effendi, H. 2003. *Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan Perairan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Eshmat, M. E., G. Mahasri dan B. S. Rahardja. 2014. Analisis Kandungan Logam Berat Timbal (Pb) dan Cadmium (Cd) Pada Kerang Hijau (*Perna viridis*

- L.) Di Perairan Ngembah Kabupaten Gresik Jawa Timur. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **6**(1): 101-108.
- Fauziah, A. R., B. S Rahardja dan Y. Cahyoko. 2012. Korelasi Ukuran Kerang Darah (*Andara granosa*) Dengan Konsentrasi Logam Berat Merkuri (Hg) Di Muara Sungai Ketingan, Sidoarjo, Jawa Timur. *Journal of Marine and Coastal Science*. **1**(1): 34-44.
- Ferdinandus, L. A. 1993. *Penggunaan Mikroskop Electron Dalam Bidang Kedokteran*. Pidato Guru Besar Universitas Airlangga. Hal 1-18
- Firmansyah, R., A. M. Hendrawan dan M. U. Riandi. 2007. Mudah dan Aktif Belajar Biologi. Grafindo Media Pratama. Hal 1-171.
- Halem, Z. M., D. J. Ross and R. L. Cox. 2014. Evidence for Intraspecific Endocrine Disruption of *Geukensia demissa* (Atlantic Ribbed Mussel) in an Urban Watershed. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **175**. 1-6.
- Hamdi, A. S. dan E. Bahruddin. 2015. *Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi Dalam Pendidikan*. Deepublish. Hal 5-6.
- Hamzah, Z., H. Ernanda, T. Indriana, A. T. W. Handayani, A. D. P. Shita, D. Indartin, Z. Meilawaty dan D. E. Indahyani. 2018. *Dampak Endocrine-Disrupting-Chemicals (Edcs) Pada Air Sungai Terhadap Kesehatan Gigi Dan Mulut*. *Prosiding The 5th Dentistry Scientific Meeting of Jember*. Hal: 46-57.
- Hanrahan, O., J. Harris and C. Egan 2011. Advanced Microscopy: Laser Scanning Confocal Microscopy. *Gene Expression Profiling: Methods And Protocols, Methode In Molecular Biology*. Vol 784. p 169-180.
- Harvey B.J. and Hoar, W.S. 1979. *The Theory and Practice of Induced Breeding in Fish*. IDRC. Ottawa. 1-48 p.
- Hassell, K. J., P. C. Coutin and D. Nugegoda. 2008. Hypoxia Impairs Embryo Development and Survival in Black Bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Marine Pollution Bulletin*. **57**(6-12): 302-306.
- Herdiansa, M. R. dan R. D. Suprihardjo. 2014. Merumuskan Kriteria Pengendalian Lahan Di Area Tambak Kecamatan Manyar, Kabupaten Gresik. *Jurnal Teknik POMITS*. **3**(2): 131-135.
- Hultin, C. L. P. Hallgren, A. Persson and M. C. Hansson. 2014. Identification of an Estrogen Receptor Gene In The Natural Freshwater Snail *Bithynia tentaculata*. *Gene*. **540**(1): 26-31.
- Isnaeni, W. 2006. *Fisiologi Hewan*. Kanisius. Yogyakarta. Hal 120-121.
- Jekle, M. dan T. Becker. 2010. Dough Microstructure: Novel Analysis By Quantification Using Confocal Scanning Microscopy. *Food Research International*. **44**: 984-991.

- Juanda, S. J. 2013. Histopaligi Gonad Ikan dan Kadar Hormon Estrogen Ikan Tawes (*Puntius javanicus*) di Sungai Surabaya, Kalimas Surabaya dan Sungai Aloo Sidoarjo. *TESIS*. Universitas Brawijaya, Malang.
- Keputusan Menteri Lingkungan Hidup (KEPMEN-LH) No.51.2004. *Baku Mutu Air Laut Untuk Biota Laut*. Jakarta.
- Khasanah, R. I., A. Sartimbul dan E. Y. Herawati. 2013. Kelimpahan dan Keanekaragaman Plankton Di Perairan Selat Bali. *Jurnal Ilmu Kelautan*. **18**(4): 193-202.
- Liliandari, P. dan Aunurohim. 2013. Kecepatan Filtrasi Kerang Hijau *Perna viridis* Terhadap *Chaetoceros* sp Dalam Media Logam Tercemar Kadmium. *Jurnal Sains dan Seni POMITS*. **2**(2): 2337-3520.
- Lubahn, D. B., J. S. Moyer., T. S. Golding.m J. F. Couse., K. S. Korach and O. Smithies. 1993. Alteration of Reproductive Function But Not Prenatal Sexual Development After Intentional Disruption of The Mouse Estrogen Receptor Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 90. p 11162-11166.
- Luzio, A., D. Santos, A. Fontainhas-Fernndes, S. M. Monteiro and A. M. Coimbra. 2016. Effect of 17 α -Ethinylestradiol at Different Water Temperatures on Zebrafish Sex Differentiation and Gonad Development. *Aquatic Toxicology*. **174**. 22-35.
- Ma, F., X. Han, L. An, K. Lei, H. Qi and G. A. LeBlanc. 2019. Freshwater Snail *Parafossarulus striatulus* Estrogen Receptor: Characteristics And Expression Profiles Under Lab and Field Exposure. *Chemosphere*. **220**. 611-619.
- Mahmudiati, N. 2011. Kajian Biologi Molekuler Peran Estrogen/ Fitoestrogen Pada Metabolisme Tulang Usia Menopause. *Prosding Seminar Nasional Biologi*. **8**(1) : 421-430.
- Marin-Gracia, J. 2007. *Chapter 18- Gender and Cardiovascular Disease*. Post-Genomic Cardiology. Academic Press. p 555-575.
- McGuire, M. and J. Stevely. 2009. Invasive Species of Florida`S Coastal Waters: The Asian Green Mussel (*Perna viridis*). *IFAS Extension*. University of Florida. 1-4.
- Mentari., M. Hamzah dan Bahtiar. 2017. Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Kerang Poeka (*Batissa violacea* Var. Celebensis, Von Martens 1897) Yang Diberi Berbagai Jenis Pakan Fermentasi. *Media Akuatika*. **2**(2): 368-376.
- Milla, S., S. Depiereux and P. Kesremont. 2011. The Effect of Estrogenic And Androgenic Endocrine Disruptors on The Immune System of Fish. *Endocrinology*. **20**: 305-319.

- Musyafak, A dan M. Ibrahim. 2005. Strategi Percepatan Adsorpsi dan Difusi Inovasi Pertanian Mendukung Prima Tani. *Jurnal Analisis Kebijakan Pertanian*. **3**(1): 20-37.
- Nagaswa, K., N. Treen, R. Kondo, Y. Otoki, N. Itoh, J. M. Rotchell and M. Osada. 2015. Molecular Characterization of an Estrogen Receptor and Estrogen-Related Receptor and Their Autoregulatory Capabilities in Two *Mytilus* Species. *Gene*. **564**(2): 153-159.
- Narulita, E., J. Prihatin dan R. S. Dewi. 2016. Pemanfaatan Hasil Induksi Hormon Estrogen Terhadap Kadar Estradiol dan Histologi Uterus Mencit (*Mus musculus*) Sebagai Buku Suplemen Sistem Reproduksi Di SMA. *Jurnal Bioedukatika*. **4**(2): 1-7.
- Ni, J., Z. Zeng and C. Ke. 2013. Sex Steroid Levels and Expression Patterns of Estrogen Receptor Gene In The Oyster *Crassostrea angulata* During Reproductive Cycle. *Aquaculture*. Vol 376-379. p 105-116.
- Olympus Corporation. 2012. <http://olympus.magnet.fsu.edu/> (diakses pada tanggal 29 April 2019).
- Parlina, I. 2019. Pengamatan Efek Pratritmen Tandan Kosong Sawit Sebelum Proses Konversi Biogas Dengan Analisis Mikroskopi. *Jurnal Teknologi Lingkungan*. **20**(1): 57-66.
- Pawley, J. 2006. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer Science & Busnies Media. Berlin.
- Pojana, G., A. Gomiero, N. Jonkers and A. Macromini. 2007. Natural and Synthetic Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) in Water, Sediment and Biota of a Coastal Lagoon. *Environment International*. **33**(7): 929-936.
- Purchase, M. M., R. Luis, C. Martines and R. Ramos. 2009. Cortisol and Glucose Reliable Indicator of Fish. *American Journal of Aquatic Science*. **4**(2): 157-178.
- Pratama, A., Wardiyanto. dan Supono. 2017. Studi Performa Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Yang Dipelihara Dengan Sistem Semi Intensif Pada Saat Penebaran. *E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. **6**(1): 643-652
- Purba, C., A. Ridlo dan J. Suprijanto. 2014. Kandungan Logam Berat Cd Pada Air, Sedimen dan Daging Kerang Hijau (*Perna viridis*) di Perairan Tanjung Mas Semarang Utara. *Journa of Marine Research*. **3**(3): 285-293.
- Purwanto, R. 2011. Peningkatan Motivasi dan Hasil Belajar Siswa Pada Kompetensi Sistem Koordinasi Melalui Metode Pembelajaran *Teaching Game Team* Terhadap Siswa Kelas XI IPA SMA Smart Ekselensia Indonesia Tahun Ajaran 2010-2011. *Jurnal Pendidikan Dompot Dhuafa Edisi I*. 1-14.
- Rahardjo, S dan Gudnanto. 2012. *Pemahaman Individu Teknik Nontes*. Kencana: 137-140.

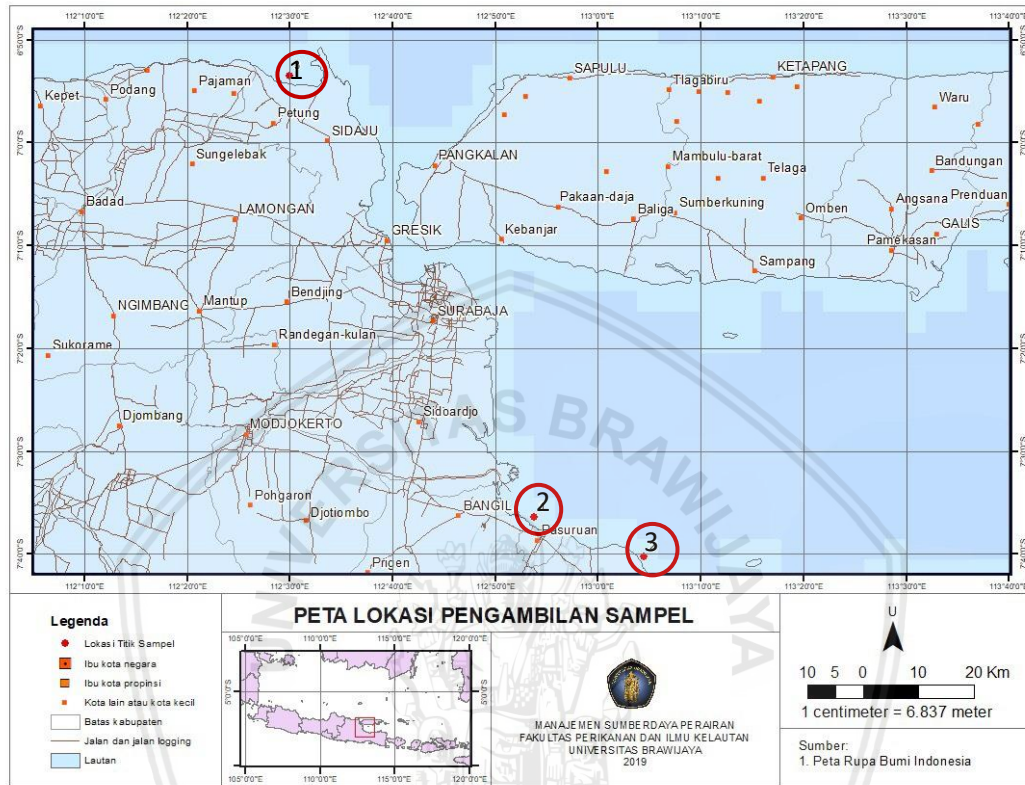
- Raingear, D., E. Bilbao, I. Cancio and M. P. Cajaraville. 2013. Retinoid X Receptor (RXR), Estrogen Receptor (ER) and Other Nuclear Receptors in Tissues of The Mussel *Mytilus galloprovincialis*: Cloning and Transcription Pattern. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. **165**(2): 178-190.
- Ratnaningsih, D. 2016. Aplikasi Passive Air Sampler Untuk Persistent Organic Pollutants Di Udara Ambien. *Jurnal ECOLAB*. **10**(1): 17-28.
- Rhee, J. S., R. O. Kim, J. S. Seo, J. Lee, Y. M. Lee and J. S. Lee. 2010. Effect of Salinity and Endocrine-Dirupting Chemicals on Expression of Prolactin and Prolactin Receptor Genes In The Euryhaline Hermaphroditic Fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **154**(4): 413-423.
- Saputri, A., M. T. S. Jhonny dan D. Rahayu. 2014. Analisis Sebaran Oksigen Terlarut Pada Sungai Raya. *Jurnal Teknologi Lingkungan Lahan Basah*. **1**(1): 1-10.
- Saputri, E. G., O. Setiani, N. Astorina dan Budiyo. 2018. Hubungan Riwayat Paparan Pestisida Dengan Kejadian Diabetes Melitus Tipe 2 Pada Petani Penyemprot Di Kecamatan Ngablak Kabupaten Magelang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. **6**(1): 645-654.
- Sari, S. H. J. Dan L. I. Harlyan. 2015. Kelayakan Kualitas Perairan Sekitar Mangrove Center Tuban Untuk Aplikasi Alat Pengumpul Kerang Hijau (*Perna viridis* L.). *Research Journal of Life Science*. **2**(1) : 60-68.
- Schung, T. T., A. Janesick., B. Blumberg and J. J. Heindel. 2011. Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **127** : 204-215.
- Sedena, I. G. N. Dan S. W. Wijaya. 2010. UTAUT Model for Understanding Learning Management System. *Internet Working Indonesia Journal*. **2**(2): 27-32.
- Sentani, R. S. A., Z. Hafy dan Subandrate. 2017. Hubungan Metode Deparafinisasi Dengan Kuantitas dan Ekstrak DNA Hasil Isolasi Dari Sampel Arsip Jaringan Dalam Blok Parafin Terfiksasi Formalin. *Jurnal Kedokteran Kesehatan*. **4**(1): 32-38.
- Setiawan, H. 2013. Pencemaran Logam Berat Di Perairan Pesisir Kota Makassar dan Upaya Penanggulangannya. *Info Teknis EBONI*. **11**(1) : 1-13.
- Setyawati, I., N. I., Wiratmini dan J. Wiryatno. 2011. Pertumbuhan, Histopatologi Ovarium dan Fekunditas Ikan Nila Merah (*Oreochromis niloticus*) Setelah Paparan Pestisida Organofosfat. *Biologi*. **25**(2): 44-48.
- Sinjal, H., F. Ibo dan H. Pangkey. 2014. Evaluasi Kombinasi Pakan dan Estradiol 17 β Terhadap Pematangan Gonad dan Kualitas Telur Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. **1**(1): 97-112.

- Sitasiwi, A. J. 2008. Hubungan Kadar Hormon Estradiol 17β dan Tebal Endometrium Uterus Mencit (*Mus musculus* L.) Selama Satu Siklus Estrus. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. **16**(2): 38-42.
- Sitasiwi, A. J. 2009. Efek Paparan Tepung Kedelai dan Tepung Tempe Sebagai Sumber Fitoestrogen Terhadap Jumlah Kelenjar Endometrium Uterus Mencit (*Mus musculus* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. **17** (1): 1-10.
- Sreedevi, P. R., V. Uthayakumar, R. Jayakumar, P. Joseph, D. S. Kumar and V. Ramasubramanian. 2014. Comparative Valuation Of On-Bottom And Off Bottom Mussel (*Perna viridis*) Culture as a Small Scale Enterprise in Chettuva Estuary At Kerala India. *World Journal of Fish And Marine Science*. **6**: 487-493.
- Sreenivasan, P. V., R. Thangavelu and P. Poovannan. 1989. Biology of The Green Mussel, *Perna viridis* (Linnaeus) Cultured In Muttukadu Lagoon, Madras. *Indian Journal Fish*. **36**(2): 149-155.
- Stange, D., A. Sieratowicz, R. Horres and J. Oehlmann. 2012. Freshwater Mudsail (*Potamopyrgus antipodarum*) Estrogen Receptor: Identification and Expression Analysis Under Exposure to (Xeno-) Hormones. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **75**. 94-101.
- Supriyantini, E. dan H. Endrawati. 2015. Kandungan Logam Berat Besi (Fe) Pada Air, Sedimen, dan Kerang Hijau (*Perna viridis*) Di Perairan Tanjung Emas Semarang. *Jurnal Kelautan Tropis*. **18**(1): 38-45.
- Susana, T. 2009. Tingkat Keasaman (pH) dan Oksigen Terlarut Sebagai Indikator Kualitas Perairan Sekitar Muara Sungai Cisade. *Jurnal Teknologi Lingkungan*. **5**(2): 33-39.
- Suseno, H. 2007. Bioakumulasi Kromium Oleh *Perna viridis* Teluk Jakarta Berdasarkan Studi Menggunakan Perunut Radioaktif ^{51}Cr . *Prosiding PPI-PDIPTN*. 82-88.
- Suyatno., A. Purwadi. H. Widayanto dan P. R. Kuncoro. 2007. *Kimia SMA kelas XI*. Grasindo. Hal 1-330.
- Syamsuri, I. 2006. Pencemaran Oleh Estradiol- 17β Di Sungai Brantas Dapat Menimbulkan Feminisasi Organisme Perairan. *Seminar Nasional MIPA*. 446-470.
- Tan, W.H. 1975. Eggs and Larva Development In The Green Mussels, *Mytilus viridis* Linnaeus. *The Veliger*. **18**:151-155.
- Temmy., S. Anggoro dan N. Widyorini. 2017. Tingkat Kerja Osmotik dan Pertumbuhan Kerang Hijau (*Perna viridis*) Yang Dikultivasi Di Perairan Tambak Lorok Semarang. *Journal of Maquares*. **6**(2): 164-172.
- Tortora, G. J. 2001. *Microbiology*. An Introduction. Addison Wesley Longman Inc. USA.

- Truscott B., D. R. Idler, Y. P. So and J. M. Walsh. 1986. Maturational Steroids and Gonadotropins In Upstream Migratory Sockeye Salmon. *Gen. Comp. Endocrinology*. 62: 99–110.
- Wang, S., S. Yuen, D. Randall, C. Hung, T. Tsui, W. Poon, J. Lai, Y. Zhang and H. Lin. 2008. Hypoxia Inhibits Fish Spawning Via LH- Dependent Final Oocyte Maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part:C Toxicology & Pharmacology*. **148**(4): 363-369.
- Wardani, D. A. K., N. K. Dewi dan N. R. Utami. 2014. Akumulasi Logam Berat Timbal (Pb) Pada Daging Kerang Hijau (*Perna viridis*) Di Muara Sungai Banjir Kanal Barat Semarang. *Unnes Journal of Life Science*. **2**(1): 1-8.
- Widasari, F. N., S. Y. Wulandari dan E. Supriyantini. 2013. Pengaruh Pemberian *Tetraselmis chuii* dan *Skeletonema costatum* Terhadap Kandungan EPA dan DHA Pada Tingkat Kematangan Gonad Kerang Totok *Polymesoda erosa*. *Journal of Marine Research*. **2**(1): 15-24.
- Wuryandari, T., T. Widiharah dan S. D. Anggraini. 2009. Metode Taguchi Untuk Optimalisasi Produk Pada Rancangan Faktorial. *Media Statistika*. **2**(2): 81-92.
- Yang, X., L. Zhao, Z. Zhao, B. Hu, C. Wang, Z. Yang and Y. Cheng. 2013. Immunolocalization of Estrogen Receptor A In *Neomysis japonica* Oocytes And Follicle Cells During Ovarian Development. *Tissue and Cell*. **44**(2): 95-100.
- Yaqin, K., L. Fachruddin dan N. F. Rahim. 2015. Studi Kandungan Timbal (Pb) Kerang Hijau, *Perna viridis* Terhadap Indeks Kondisinya. *Jurnal Lingkungan Indonesia*. **3**(6): 309-317.
- Yaqin, K., Nursyamsiah, M. T. Umar, L. Fachruddin dan B. Bachtiar. 2014. Apakah Variasi Ukuran Panjang Cangkang Mempengaruhi Konsentrasi Logam Timbal Di Dalam Daging Kerang Hijau *Perna viridis*?. *Simposium Nasional I Kelautan dan Perikanan Makasar*. 1-13.
- Zhang, H., L. Pan and L. Zhang. 2012. Molecular Cloning and Characterization of Estrogen Receptor Gene in The Scallop *Chlamys farreri*: Expression Profiles in Response to Endocrine Disrupting Chmicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **156**(1): 51-57.
- Zoeller, R. T., T. R. Brown, L. L. Doan, A. C. Gore, N. E. Skakkebaek, A. M. Soto, T. J. Woodruff and F. S. Vom saal. 2012. Endocrine-Disrupting Chemicals And Public Health Protection: A Statement of Princples From The Endocrine Society. *Endocrinology*. **153**(9): 4097-4110.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Peta Lokasi Penelitian



Lampiran 2. Alat dan Bahan

Alat

Kegiatan penelitian	Alat	Kegunaan
Pengambilan sampel kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)	coolbox	Untuk wadah kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) dari stasiun penelitian ke laboratorium
	Sectio set	Untuk membedah dan mengambil gonad kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)
	Jangka sorong	Untuk mengukur panjang dan lebar cangkang kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)
	Botol film	Untuk wadah gonad kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)
	Timbangan digital	Untuk menimbang berat tubuh kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)
	Alat tulis	Untuk mencatat data-data yang dibutuhkan
	Kamera digital	Untuk mendokumentasikan kegiatan
	Aerator	Untuk menyuplai oksigen kerang hijau pada saat perjalanan
Analisis kualitas air	DO meter	Untuk mengukur oksigen terlarut dan suhu di dalam perairan
	pH meter	Untuk mengukur pH perairan
	Refraktometer	Untuk mengukur kadar salinitas perairan
	Alat tulis	Untuk mencatat data-data yang dibutuhkan
	Kamera digital	Untuk mendokumentasikan kegiatan
imunohistokimia	Sarung tangan	Untuk melindungi tangan dari larutan berbahaya
	Mikropipet	Untuk mengambil cairan dalam skala kecil secara akurat
	Beker glass	Untuk wadah PBST
	Cover glass	Untuk menutup objek yang akan diamati
	Baskom	Untuk tempat PBST yang sudah tidak digunakan
	Oven	Untuk mengoven sampel
	Nampan	Untuk wadah meletakkan preparat



	Kamera digital	Untuk mendokumentasikan kegiatan
	<i>Platform shakers-rocking</i>	Untuk mencuci preparat dengan cara mengocok sesuai dengan kecepatan putaran
	Pinset	Untuk mengambil dan memindahkan preparat
	Stopwatch	Untuk mengukur lamanya waktu yang diperlukan
	Confocal laser scanning microscopy (CLSM)	Untuk melihat dan menganalisa sampel berdasarkan pendaran warna

Bahan

Kegiatan penelitian	Bahan	Kegunaan
Pengambilan sampel kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)	Formalin 10%	Sebagai pengawet gonad kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)
	Tisu	Sebagai pengering dan pembersih alat
	Air laut	Sebagai media hidup kerang hijau (<i>Perna viridis</i>)
Analisis kualitas air	Aquades	Kalibrasi DO meter, pH meter dan Refraktometer
	Tisu	Sebagai pengering dan pembersih alat
Imunohistokimia	<i>Xylo</i>	Untuk menghilangkan parafin pada preparat
	Etanol absolut	Untuk membersihkan sisa <i>xylo</i>
	Etanol 70%	Untuk pengkondisian jaringan
	Etanol 90%	Untuk pengkondisian jaringan
	<i>Phospat buffer saline tween 20 (PBST)</i>	Untuk memaksimalkan agar preparat bersih dari etanol
	<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Untuk memblocking protein non target
	Tisu	Sebagai pengering dan pembersih alat
	Antibodi primer (anti <i>estrogen receptor</i> TRITC)	Untuk mengikat antigen secara spesifik
	Antibodi primer (anti estradiol FITC)	Untuk mengikat antigen secara spesifik

Lampiran 3. Data Region Measurement Estrogen Reseptor Gonad Kerang Hijau (*Perna Viridis*)

1. Perairan Kaligung Pasuruan

a. Jantan

• S1J1 A

Region Measurement - S1J1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	142.407	150.514	89917.21	1212.384	29917386	128.311	1854	0	1854	103.644	310.933	42018814	180.212	3107	0	3107	163.604	490.813	3.31E+08	1421.629	4095	487	3608	572.067	1716.2	
Max	142.407	150.514	89917.21	1212.384	29917386	128.311	1854	0	1854	103.644	310.933	42018814	180.212	3107	0	3107	163.604	490.813	3.31E+08	1421.629	4095	487	3608	572.067	1716.2	
Min	142.407	150.514	89917.21	1212.384	29917386	128.311	1854	0	1854	103.644	310.933	42018814	180.212	3107	0	3107	163.604	490.813	3.31E+08	1421.629	4095	487	3608	572.067	1716.2	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	142.407	150.514	89917.21	1212.384	29917386	128.311	1854	0	1854	103.644	310.933	42018814	180.212	3107	0	3107	163.604	490.813	3.31E+08	1421.629	4095	487	3608	572.067	1716.2	



• S1J1 B

Region Measurement - S1J1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	36144181	138.963	1509	0	1509	109.158	327.474	50095644	192.601	3309	0	3309	169.115	507.345	3.56E+08	1370.373	4095	477	3618	496.16	1488.48
Max	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	36144181	138.963	1509	0	1509	109.158	327.474	50095644	192.601	3309	0	3309	169.115	507.345	3.56E+08	1370.373	4095	477	3618	496.16	1488.48
Min	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	36144181	138.963	1509	0	1509	109.158	327.474	50095644	192.601	3309	0	3309	169.115	507.345	3.56E+08	1370.373	4095	477	3618	496.16	1488.48
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	36144181	138.963	1509	0	1509	109.158	327.474	50095644	192.601	3309	0	3309	169.115	507.345	3.56E+08	1370.373	4095	477	3618	496.16	1488.48

• S1J2 A

Region Measurement - S1J2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.976	153.697	97743.03	1250.694	317.331	308.016	30077678	118.67	2725	0	2725	113.781	341.342	35891411	141.608	3912	0	3912	156.95	470.851	3.6E+08	1419.908	4095	527	3568	538.245	1614.734
Max	158.976	153.697	97743.03	1250.694	317.331	308.016	30077678	118.67	2725	0	2725	113.781	341.342	35891411	141.608	3912	0	3912	156.95	470.851	3.6E+08	1419.908	4095	527	3568	538.245	1614.734
Min	158.976	153.697	97743.03	1250.694	317.331	308.016	30077678	118.67	2725	0	2725	113.781	341.342	35891411	141.608	3912	0	3912	156.95	470.851	3.6E+08	1419.908	4095	527	3568	538.245	1614.734
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	158.976	153.697	97743.03	1250.694	317.331	308.016	30077678	118.67	2725	0	2725	113.781	341.342	35891411	141.608	3912	0	3912	156.95	470.851	3.6E+08	1419.908	4095	527	3568	538.245	1614.734

• S1J2 B

Region Measurement - S1J2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21140016	81.276	1578	0	1578	102.626	307.879	26601221	102.273	2409	0	2409	141.444	424.331	3.56E+08	1369.476	4095	481	3614	512.517	1537.55
Max	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21140016	81.276	1578	0	1578	102.626	307.879	26601221	102.273	2409	0	2409	141.444	424.331	3.56E+08	1369.476	4095	481	3614	512.517	1537.55
Min	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21140016	81.276	1578	0	1578	102.626	307.879	26601221	102.273	2409	0	2409	141.444	424.331	3.56E+08	1369.476	4095	481	3614	512.517	1537.55
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	
2	158.045	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21140016	81.276	1578	0	1578	102.626	307.879	26601221	102.273	2409	0	2409	141.444	424.331	3.56E+08	1369.476	4095	481	3614	512.517	1537.55

• S1J3 A

Region Measurement - S1J3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	46776417	178.438	2543	0	2543	133.978	401.934	51989579	198.325	4065	0	4065	178.118	534.355	3.77E+08	1436.847	4095	519	3576	545.146	1635.438
Max	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	46776417	178.438	2543	0	2543	133.978	401.934	51989579	198.325	4065	0	4065	178.118	534.355	3.77E+08	1436.847	4095	519	3576	545.146	1635.438
Min	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	46776417	178.438	2543	0	2543	133.978	401.934	51989579	198.325	4065	0	4065	178.118	534.355	3.77E+08	1436.847	4095	519	3576	545.146	1635.438
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	
2	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	46776417	178.438	2543	0	2543	133.978	401.934	51989579	198.325	4065	0	4065	178.118	534.355	3.77E+08	1436.847	4095	519	3576	545.146	1635.438

• S1J3 B

Region Measurement - S1J3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.205	116.701	91173.63	1186.946	19928101	84.291	1347	0	1347	99.663	298.988	24320645	102.87	2568	0	2568	139.133	417.4	3.39E+08	1432.865	4095	524	3571	511.654	1534.963	
Max	158.205	116.701	91173.63	1186.946	19928101	84.291	1347	0	1347	99.663	298.988	24320645	102.87	2568	0	2568	139.133	417.4	3.39E+08	1432.865	4095	524	3571	511.654	1534.963	
Min	158.205	116.701	91173.63	1186.946	19928101	84.291	1347	0	1347	99.663	298.988	24320645	102.87	2568	0	2568	139.133	417.4	3.39E+08	1432.865	4095	524	3571	511.654	1534.963	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.205	116.701	91173.63	1186.946	19928101	84.291	1347	0	1347	99.663	298.988	24320645	102.87	2568	0	2568	139.133	417.4	3.39E+08	1432.865	4095	524	3571	511.654	1534.963	

b. Betina

• S1B1 A

Region Measurement - S1B1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	41124625	157.493	3174	0	3174	154.742	464.225	52770858	202.094	4028	0	4028	209.373	628.118	3.72E+08	1424.538	4095	522	3573	472.146	1416.439
Max	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	41124625	157.493	3174	0	3174	154.742	464.225	52770858	202.094	4028	0	4028	209.373	628.118	3.72E+08	1424.538	4095	522	3573	472.146	1416.439
Min	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	41124625	157.493	3174	0	3174	154.742	464.225	52770858	202.094	4028	0	4028	209.373	628.118	3.72E+08	1424.538	4095	522	3573	472.146	1416.439
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	41124625	157.493	3174	0	3174	154.742	464.225	52770858	202.094	4028	0	4028	209.373	628.118	3.72E+08	1424.538	4095	522	3573	472.146	1416.439

• S1B1 B

Region Measurement - S1B1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.976	158.665	100501.9	1268.082	317.331	316.71	39098324	150.026	1773	0	1773	140.516	421.548	49660777	190.556	2807	0	2807	192.841	578.524	3.73E+08	1429.891	4095	557	3538	450.667	1352.002
Max	158.976	158.665	100501.9	1268.082	317.331	316.71	39098324	150.026	1773	0	1773	140.516	421.548	49660777	190.556	2807	0	2807	192.841	578.524	3.73E+08	1429.891	4095	557	3538	450.667	1352.002
Min	158.976	158.665	100501.9	1268.082	317.331	316.71	39098324	150.026	1773	0	1773	140.516	421.548	49660777	190.556	2807	0	2807	192.841	578.524	3.73E+08	1429.891	4095	557	3538	450.667	1352.002
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	
2	158.976	158.665	100501.9	1268.082	317.331	316.71	39098324	150.026	1773	0	1773	140.516	421.548	49660777	190.556	2807	0	2807	192.841	578.524	3.73E+08	1429.891	4095	557	3538	450.667	1352.002

• S1B2 A

Region Measurement - S1B2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.976	153.077	97348.9	1248.21	317.331	306.774	64105281	253.949	2079	0	2079	202.739	608.218	82300792	326.029	3286	0	3286	262.916	788.747	3.65E+08	1444.503	4095	515	3580	544.855	1634.566
Max	158.976	153.077	97348.9	1248.21	317.331	306.774	64105281	253.949	2079	0	2079	202.739	608.218	82300792	326.029	3286	0	3286	262.916	788.747	3.65E+08	1444.503	4095	515	3580	544.855	1634.566
Min	158.976	153.077	97348.9	1248.21	317.331	306.774	64105281	253.949	2079	0	2079	202.739	608.218	82300792	326.029	3286	0	3286	262.916	788.747	3.65E+08	1444.503	4095	515	3580	544.855	1634.566
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	
2	158.976	153.077	97348.9	1248.21	317.331	306.774	64105281	253.949	2079	0	2079	202.739	608.218	82300792	326.029	3286	0	3286	262.916	788.747	3.65E+08	1444.503	4095	515	3580	544.855	1634.566

• S1B2 B

Region Measurement - S1B2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																									
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	141.354	217.624	59740.8	983.949	29268775	188.937	2576	0	2576	176.763	530.289	38556671	248.892	3041	0	3041	231.726	695.179	2.14E+08	1378.24	4095	533	3562	444.542	1333.626
Max	141.354	217.624	59740.8	983.949	29268775	188.937	2576	0	2576	176.763	530.289	38556671	248.892	3041	0	3041	231.726	695.179	2.14E+08	1378.24	4095	533	3562	444.542	1333.626
Min	141.354	217.624	59740.8	983.949	29268775	188.937	2576	0	2576	176.763	530.289	38556671	248.892	3041	0	3041	231.726	695.179	2.14E+08	1378.24	4095	533	3562	444.542	1333.626
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	141.354	217.624	59740.8	983.949	29268775	188.937	2576	0	2576	176.763	530.289	38556671	248.892	3041	0	3041	231.726	695.179	2.14E+08	1378.24	4095	533	3562	444.542	1333.626

• S1B3 A

Region Measurement - S1B3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																									
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	146.138	156.817	90534.62	1187.832	42191181	179.717	2692	0	2692	171.16	513.48	47802216	203.618	4054	0	4054	207.064	621.191	3.37E+08	1435.999	4095	489	3606	528.452	1585.355
Max	146.138	156.817	90534.62	1187.832	42191181	179.717	2692	0	2692	171.16	513.48	47802216	203.618	4054	0	4054	207.064	621.191	3.37E+08	1435.999	4095	489	3606	528.452	1585.355
Min	146.138	156.817	90534.62	1187.832	42191181	179.717	2692	0	2692	171.16	513.48	47802216	203.618	4054	0	4054	207.064	621.191	3.37E+08	1435.999	4095	489	3606	528.452	1585.355
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	146.138	156.817	90534.62	1187.832	42191181	179.717	2692	0	2692	171.16	513.48	47802216	203.618	4054	0	4054	207.064	621.191	3.37E+08	1435.999	4095	489	3606	528.452	1585.355

• S1B3 B

Region Measurement - S1B3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	33292683	127.499	1401	0	1401	121.675	365.026	44144083	169.056	1921	0	1921	175.327	525.982	3.78E+08	1446.938	4095	561	3534	453.869	1361.607
Max	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	33292683	127.499	1401	0	1401	121.675	365.026	44144083	169.056	1921	0	1921	175.327	525.982	3.78E+08	1446.938	4095	561	3534	453.869	1361.607
Min	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	33292683	127.499	1401	0	1401	121.675	365.026	44144083	169.056	1921	0	1921	175.327	525.982	3.78E+08	1446.938	4095	561	3534	453.869	1361.607
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	33292683	127.499	1401	0	1401	121.675	365.026	44144083	169.056	1921	0	1921	175.327	525.982	3.78E+08	1446.938	4095	561	3534	453.869	1361.607

2. Perairan Nguling

a. Jantan

• S2J1 A

Region Measurement - S2J1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	14229588	54.494	1251	0	1251	67.269	201.807	21185216	81.132	1821	0	1821	109.644	328.932	3.6E+08	1377.994	4095	521	3574	462.446	1387.338
Max	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	14229588	54.494	1251	0	1251	67.269	201.807	21185216	81.132	1821	0	1821	109.644	328.932	3.6E+08	1377.994	4095	521	3574	462.446	1387.338
Min	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	14229588	54.494	1251	0	1251	67.269	201.807	21185216	81.132	1821	0	1821	109.644	328.932	3.6E+08	1377.994	4095	521	3574	462.446	1387.338
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	14229588	54.494	1251	0	1251	67.269	201.807	21185216	81.132	1821	0	1821	109.644	328.932	3.6E+08	1377.994	4095	521	3574	462.446	1387.338

• S2J1 B

Region Measurement - S2J1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	184.34	133.809	100107.4	1253.876	14264100	54.949	1342	0	1342	69.747	209.242	20741454	79.902	2856	0	2856	111.678	335.033	3.56E+08	1369.584	4095	502	3593	461.217	1383.651	
Max	184.34	133.809	100107.4	1253.876	14264100	54.949	1342	0	1342	69.747	209.242	20741454	79.902	2856	0	2856	111.678	335.033	3.56E+08	1369.584	4095	502	3593	461.217	1383.651	
Min	184.34	133.809	100107.4	1253.876	14264100	54.949	1342	0	1342	69.747	209.242	20741454	79.902	2856	0	2856	111.678	335.033	3.56E+08	1369.584	4095	502	3593	461.217	1383.651	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	184.34	133.809	100107.4	1253.876	14264100	54.949	1342	0	1342	69.747	209.242	20741454	79.902	2856	0	2856	111.678	335.033	3.56E+08	1369.584	4095	502	3593	461.217	1383.651	

• S2J2 A

Region Measurement - S2J2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	23620490	91.17	1815	0	1815	106.817	320.452	35365084	136.502	2470	0	2470	166.361	499.083	3.67E+08	1415.592	4095	494	3601	541.376	1624.129
Max	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	23620490	91.17	1815	0	1815	106.817	320.452	35365084	136.502	2470	0	2470	166.361	499.083	3.67E+08	1415.592	4095	494	3601	541.376	1624.129
Min	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	23620490	91.17	1815	0	1815	106.817	320.452	35365084	136.502	2470	0	2470	166.361	499.083	3.67E+08	1415.592	4095	494	3601	541.376	1624.129
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	23620490	91.17	1815	0	1815	106.817	320.452	35365084	136.502	2470	0	2470	166.361	499.083	3.67E+08	1415.592	4095	494	3601	541.376	1624.129

• S2J2 B

Region Measurement - S2J2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	22850230	87.508	1586	0	1586	98.481	295.444	32480301	124.388	2796	0	2796	150.441	451.324	3.78E+08	1445.797	4095	504	3591	534.944	1604.832
Max	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	22850230	87.508	1586	0	1586	98.481	295.444	32480301	124.388	2796	0	2796	150.441	451.324	3.78E+08	1445.797	4095	504	3591	534.944	1604.832
Min	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	22850230	87.508	1586	0	1586	98.481	295.444	32480301	124.388	2796	0	2796	150.441	451.324	3.78E+08	1445.797	4095	504	3591	534.944	1604.832
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	22850230	87.508	1586	0	1586	98.481	295.444	32480301	124.388	2796	0	2796	150.441	451.324	3.78E+08	1445.797	4095	504	3591	534.944	1604.832

• S2J3 A

Region Measurement - S2J3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev		
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1		
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Average	120.662	157.777	87088.54	1153.45	14690850	65.053	2011	0	2011	85.929	257.786	24807901	109.853	2725	0	2725	142.968	428.905	3.09E+08	1367.136	4095	476	3619	526.708	1580.124		
Max	120.662	157.777	87088.54	1153.45	14690850	65.053	2011	0	2011	85.929	257.786	24807901	109.853	2725	0	2725	142.968	428.905	3.09E+08	1367.136	4095	476	3619	526.708	1580.124		
Min	120.662	157.777	87088.54	1153.45	14690850	65.053	2011	0	2011	85.929	257.786	24807901	109.853	2725	0	2725	142.968	428.905	3.09E+08	1367.136	4095	476	3619	526.708	1580.124		
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev		
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1		
2	120.662	157.777	87088.54	1153.45	14690850	65.053	2011	0	2011	85.929	257.786	24807901	109.853	2725	0	2725	142.968	428.905	3.09E+08	1367.136	4095	476	3619	526.708	1580.124		

• S2J3 B

Region Measurement - S2J3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	162.143	124.38	37166.15	718.226	6283916	65.203	1225	0	1225	81.932	245.796	13005837	134.95	2519	0	2519	143.848	431.545	1.32E+08	1373.751	4095	511	3584	353.162	1059.486	
Max	162.143	124.38	37166.15	718.226	6283916	65.203	1225	0	1225	81.932	245.796	13005837	134.95	2519	0	2519	143.848	431.545	1.32E+08	1373.751	4095	511	3584	353.162	1059.486	
Min	162.143	124.38	37166.15	718.226	6283916	65.203	1225	0	1225	81.932	245.796	13005837	134.95	2519	0	2519	143.848	431.545	1.32E+08	1373.751	4095	511	3584	353.162	1059.486	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	162.143	124.38	37166.15	718.226	6283916	65.203	1225	0	1225	81.932	245.796	13005837	134.95	2519	0	2519	143.848	431.545	1.32E+08	1373.751	4095	511	3584	353.162	1059.486	

b. Betina

• S2B1 A

Region Measurement - S2B1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	59932173	228.623	2081	3	2078	203.509	610.526	78751903	300.415	3154	0	3154	283.753	851.259	3.94E+08	1503.017	4095	542	3553	501.124	1503.372
Max	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	59932173	228.623	2081	3	2078	203.509	610.526	78751903	300.415	3154	0	3154	283.753	851.259	3.94E+08	1503.017	4095	542	3553	501.124	1503.372
Min	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	59932173	228.623	2081	3	2078	203.509	610.526	78751903	300.415	3154	0	3154	283.753	851.259	3.94E+08	1503.017	4095	542	3553	501.124	1503.372
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.666	158.666	101093.5	1271.808	317.952	317.952	59932173	228.623	2081	3	2078	203.509	610.526	78751903	300.415	3154	0	3154	283.753	851.259	3.94E+08	1503.017	4095	542	3553	501.124	1503.372

• S2B1 B

Region Measurement - S2B1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	152.896	112.132	98495.8	1278.32	55781599	218.402	2831	4	2827	219.951	659.852	77853113	304.819	4006	0	4006	312.244	936.733	3.89E+08	1522.369	4095	546	3549	538.019	1614.056	
Max	152.896	112.132	98495.8	1278.32	55781599	218.402	2831	4	2827	219.951	659.852	77853113	304.819	4006	0	4006	312.244	936.733	3.89E+08	1522.369	4095	546	3549	538.019	1614.056	
Min	152.896	112.132	98495.8	1278.32	55781599	218.402	2831	4	2827	219.951	659.852	77853113	304.819	4006	0	4006	312.244	936.733	3.89E+08	1522.369	4095	546	3549	538.019	1614.056	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	152.896	112.132	98495.8	1278.32	55781599	218.402	2831	4	2827	219.951	659.852	77853113	304.819	4006	0	4006	312.244	936.733	3.89E+08	1522.369	4095	546	3549	538.019	1614.056	

• S2B2 A

Region Measurement - S2B2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	165.519	116.601	40928.08	852.947	24635512	232.126	2164	0	2164	217.221	651.664	34328380	323.456	2965	0	2965	303.731	911.192	1.71E+08	1615.57	4095	596	3499	563.312	1689.937	
Max	165.519	116.601	40928.08	852.947	24635512	232.126	2164	0	2164	217.221	651.664	34328380	323.456	2965	0	2965	303.731	911.192	1.71E+08	1615.57	4095	596	3499	563.312	1689.937	
Min	165.519	116.601	40928.08	852.947	24635512	232.126	2164	0	2164	217.221	651.664	34328380	323.456	2965	0	2965	303.731	911.192	1.71E+08	1615.57	4095	596	3499	563.312	1689.937	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	165.519	116.601	40928.08	852.947	24635512	232.126	2164	0	2164	217.221	651.664	34328380	323.456	2965	0	2965	303.731	911.192	1.71E+08	1615.57	4095	596	3499	563.312	1689.937	

• S2B2 B

Region Measurement - S2B2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	167.262	195.758	73393.27	1127.503	38734360	203.528	1735	0	1735	196.88	590.64	51239756	269.237	2576	0	2576	263.124	789.372	2.85E+08	1498.611	4095	0	4095	592.104	1776.312	
Max	167.262	195.758	73393.27	1127.503	38734360	203.528	1735	0	1735	196.88	590.64	51239756	269.237	2576	0	2576	263.124	789.372	2.85E+08	1498.611	4095	0	4095	592.104	1776.312	
Min	167.262	195.758	73393.27	1127.503	38734360	203.528	1735	0	1735	196.88	590.64	51239756	269.237	2576	0	2576	263.124	789.372	2.85E+08	1498.611	4095	0	4095	592.104	1776.312	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	167.262	195.758	73393.27	1127.503	38734360	203.528	1735	0	1735	196.88	590.64	51239756	269.237	2576	0	2576	263.124	789.372	2.85E+08	1498.611	4095	0	4095	592.104	1776.312	

• S2B3 A

Region Measurement - S2B3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.976	157.734	100304.8	1266.84	317.331	316.089	36481025	140.258	2274	0	2274	179.614	538.843	50441064	193.93	4095	0	4095	251.039	753.116	3.77E+08	1448.5	4095	547	3548	493.69	1481.069
Max	158.976	157.734	100304.8	1266.84	317.331	316.089	36481025	140.258	2274	0	2274	179.614	538.843	50441064	193.93	4095	0	4095	251.039	753.116	3.77E+08	1448.5	4095	547	3548	493.69	1481.069
Min	158.976	157.734	100304.8	1266.84	317.331	316.089	36481025	140.258	2274	0	2274	179.614	538.843	50441064	193.93	4095	0	4095	251.039	753.116	3.77E+08	1448.5	4095	547	3548	493.69	1481.069
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.976	157.734	100304.8	1266.84	317.331	316.089	36481025	140.258	2274	0	2274	179.614	538.843	50441064	193.93	4095	0	4095	251.039	753.116	3.77E+08	1448.5	4095	547	3548	493.69	1481.069

• S2B3 B

Region Measurement - S2B3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	50393997	192.991	2158	0	2158	213.571	640.712	67863953	259.895	3093	0	3093	285.747	857.242	3.84E+08	1471.244	4095	482	3613	543.291	1629.873
Max	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	50393997	192.991	2158	0	2158	213.571	640.712	67863953	259.895	3093	0	3093	285.747	857.242	3.84E+08	1471.244	4095	482	3613	543.291	1629.873
Min	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	50393997	192.991	2158	0	2158	213.571	640.712	67863953	259.895	3093	0	3093	285.747	857.242	3.84E+08	1471.244	4095	482	3613	543.291	1629.873
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	50393997	192.991	2158	0	2158	213.571	640.712	67863953	259.895	3093	0	3093	285.747	857.242	3.84E+08	1471.244	4095	482	3613	543.291	1629.873

3. Perairan Ngemboh

a. Jantan

• S3J1 A

Region Measurement - S3J1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	23927403	91.633	2783	0	2783	105.431	316.294	29562146	113.212	3985	0	3985	154.992	464.975	3.68E+08	1409.043	4095	513	3582	492.173	1476.518
Max	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	23927403	91.633	2783	0	2783	105.431	316.294	29562146	113.212	3985	0	3985	154.992	464.975	3.68E+08	1409.043	4095	513	3582	492.173	1476.518
Min	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	23927403	91.633	2783	0	2783	105.431	316.294	29562146	113.212	3985	0	3985	154.992	464.975	3.68E+08	1409.043	4095	513	3582	492.173	1476.518
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	158.976	158.355	100699	1269.324	317.331	317.331	23927403	91.633	2783	0	2783	105.431	316.294	29562146	113.212	3985	0	3985	154.992	464.975	3.68E+08	1409.043	4095	513	3582	492.173	1476.518

• S3J1 B

Region Measurement - S3J1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	24934294	95.864	2063	0	2063	105.323	315.969	32077809	123.329	3520	0	3520	154.787	464.36	3.66E+08	1407.707	4095	517	3578	519.79	1559.371
Max	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	24934294	95.864	2063	0	2063	105.323	315.969	32077809	123.329	3520	0	3520	154.787	464.36	3.66E+08	1407.707	4095	517	3578	519.79	1559.371
Min	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	24934294	95.864	2063	0	2063	105.323	315.969	32077809	123.329	3520	0	3520	154.787	464.36	3.66E+08	1407.707	4095	517	3578	519.79	1559.371
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	24934294	95.864	2063	0	2063	105.323	315.969	32077809	123.329	3520	0	3520	154.787	464.36	3.66E+08	1407.707	4095	517	3578	519.79	1559.371

• S3J2 A

Region Measurement - S3J2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	35345159	135.359	2920	0	2920	137.322	411.966	46790742	179.192	3925	0	3925	201.19	603.571	3.64E+08	1392.938	4095	493	3602	517.094	1551.282
Max	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	35345159	135.359	2920	0	2920	137.322	411.966	46790742	179.192	3925	0	3925	201.19	603.571	3.64E+08	1392.938	4095	493	3602	517.094	1551.282
Min	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	35345159	135.359	2920	0	2920	137.322	411.966	46790742	179.192	3925	0	3925	201.19	603.571	3.64E+08	1392.938	4095	493	3602	517.094	1551.282
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.355	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	35345159	135.359	2920	0	2920	137.322	411.966	46790742	179.192	3925	0	3925	201.19	603.571	3.64E+08	1392.938	4095	493	3602	517.094	1551.282

• S3J2 B

Region Measurement - S3J2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	29533203	113.546	3103	0	3103	124.45	373.349	38109192	146.517	4095	0	4095	180.08	540.24	3.63E+08	1394.788	4095	503	3592	481.4	1444.2
Max	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	29533203	113.546	3103	0	3103	124.45	373.349	38109192	146.517	4095	0	4095	180.08	540.24	3.63E+08	1394.788	4095	503	3592	481.4	1444.2
Min	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	29533203	113.546	3103	0	3103	124.45	373.349	38109192	146.517	4095	0	4095	180.08	540.24	3.63E+08	1394.788	4095	503	3592	481.4	1444.2
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	29533203	113.546	3103	0	3103	124.45	373.349	38109192	146.517	4095	0	4095	180.08	540.24	3.63E+08	1394.788	4095	503	3592	481.4	1444.2

• S3J3 A

Region Measurement - S3J3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	28387667	109.571	2694	0	2694	118.773	356.32	36033029	139.08	4021	0	4021	170.633	511.9	3.53E+08	1363.149	4095	477	3618	490.67	1472.011
Max	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	28387667	109.571	2694	0	2694	118.773	356.32	36033029	139.08	4021	0	4021	170.633	511.9	3.53E+08	1363.149	4095	477	3618	490.67	1472.011
Min	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	28387667	109.571	2694	0	2694	118.773	356.32	36033029	139.08	4021	0	4021	170.633	511.9	3.53E+08	1363.149	4095	477	3618	490.67	1472.011
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.976	159.597	99912.26	1264.356	316.089	316.089	28387667	109.571	2694	0	2694	118.773	356.32	36033029	139.08	4021	0	4021	170.633	511.9	3.53E+08	1363.149	4095	477	3618	490.67	1472.011

• S3J3 B

Region Measurement - S3J3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.665	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21302049	81.899	2356	0	2356	102.256	306.769	30045957	115.517	4003	0	4003	156.666	469.997	3.57E+08	1371.847	4095	485	3610	497.161	1491.483
Max	158.665	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21302049	81.899	2356	0	2356	102.256	306.769	30045957	115.517	4003	0	4003	156.666	469.997	3.57E+08	1371.847	4095	485	3610	497.161	1491.483
Min	158.665	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21302049	81.899	2356	0	2356	102.256	306.769	30045957	115.517	4003	0	4003	156.666	469.997	3.57E+08	1371.847	4095	485	3610	497.161	1491.483
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	158.665	159.287	100305.2	1266.84	316.71	316.71	21302049	81.899	2356	0	2356	102.256	306.769	30045957	115.517	4003	0	4003	156.666	469.997	3.57E+08	1371.847	4095	485	3610	497.161	1491.483

b. Betina

• S3B1 A

Region Measurement - S3B1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev		
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	164.633	159.36	52306.42	873.982	28834774	212.591	2279	0	2279	230.732	692.195	40312509	297.213	4095	0	4095	343.974	1031.921	2.02E+08	1487.387	4095	533	3562	514.556	1543.669		
Max	164.633	159.36	52306.42	873.982	28834774	212.591	2279	0	2279	230.732	692.195	40312509	297.213	4095	0	4095	343.974	1031.921	2.02E+08	1487.387	4095	533	3562	514.556	1543.669		
Min	164.633	159.36	52306.42	873.982	28834774	212.591	2279	0	2279	230.732	692.195	40312509	297.213	4095	0	4095	343.974	1031.921	2.02E+08	1487.387	4095	533	3562	514.556	1543.669		
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev		
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	164.633	159.36	52306.42	873.982	28834774	212.591	2279	0	2279	230.732	692.195	40312509	297.213	4095	0	4095	343.974	1031.921	2.02E+08	1487.387	4095	533	3562	514.556	1543.669		

• S3B1 B

Region Measurement - S3B1 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																										
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	124.382	177.258	93727.35	1253.067	58421188	240.374	3544	0	3544	212.357	637.071	75263225	309.67	4095	0	4095	287.862	863.586	3.54E+08	1454.518	4095	552	3543	456.292	1368.877	
Max	124.382	177.258	93727.35	1253.067	58421188	240.374	3544	0	3544	212.357	637.071	75263225	309.67	4095	0	4095	287.862	863.586	3.54E+08	1454.518	4095	552	3543	456.292	1368.877	
Min	124.382	177.258	93727.35	1253.067	58421188	240.374	3544	0	3544	212.357	637.071	75263225	309.67	4095	0	4095	287.862	863.586	3.54E+08	1454.518	4095	552	3543	456.292	1368.877	
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	124.382	177.258	93727.35	1253.067	58421188	240.374	3544	0	3544	212.357	637.071	75263225	309.67	4095	0	4095	287.862	863.586	3.54E+08	1454.518	4095	552	3543	456.292	1368.877	

• S3B2 A

Region Measurement - S3B2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X A.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	45380801	173.792	2375	0	2375	187.083	561.25	95546743	365.91	4095	0	4095	392.187	1176.562	3.83E+08	1465.897	4095	523	3572	506.286	1518.858
Max	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	45380801	173.792	2375	0	2375	187.083	561.25	95546743	365.91	4095	0	4095	392.187	1176.562	3.83E+08	1465.897	4095	523	3572	506.286	1518.858
Min	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	45380801	173.792	2375	0	2375	187.083	561.25	95546743	365.91	4095	0	4095	392.187	1176.562	3.83E+08	1465.897	4095	523	3572	506.286	1518.858
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1		
2	158.976	158.976	100699	1269.324	317.331	317.331	45380801	173.792	2375	0	2375	187.083	561.25	95546743	365.91	4095	0	4095	392.187	1176.562	3.83E+08	1465.897	4095	523	3572	506.286	1518.858

• S3B2 B

Region Measurement - S3B2 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	45086680	173.344	1978	0	1978	178.977	536.932	52591026	202.195	2556	0	2556	230.655	691.966	3.77E+08	1450.303	4095	518	3577	466.876	1400.629
Max	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	45086680	173.344	1978	0	1978	178.977	536.932	52591026	202.195	2556	0	2556	230.655	691.966	3.77E+08	1450.303	4095	518	3577	466.876	1400.629
Min	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	45086680	173.344	1978	0	1978	178.977	536.932	52591026	202.195	2556	0	2556	230.655	691.966	3.77E+08	1450.303	4095	518	3577	466.876	1400.629
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	159.287	158.045	100305.2	1266.84	316.71	316.71	45086680	173.344	1978	0	1978	178.977	536.932	52591026	202.195	2556	0	2556	230.655	691.966	3.77E+08	1450.303	4095	518	3577	466.876	1400.629

• S3B3 A

Region Measurement - S3B3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X C.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Average	158.666	158.045	100698.6	1269.324	317.952	316.71	41376979	158.46	2397	0	2397	194.009	582.027	57406766	219.848	2775	0	2775	269.828	809.485	3.77E+08	1442.372	4095	502	3593	486.563	1459.688
Max	158.666	158.045	100698.6	1269.324	317.952	316.71	41376979	158.46	2397	0	2397	194.009	582.027	57406766	219.848	2775	0	2775	269.828	809.485	3.77E+08	1442.372	4095	502	3593	486.563	1459.688
Min	158.666	158.045	100698.6	1269.324	317.952	316.71	41376979	158.46	2397	0	2397	194.009	582.027	57406766	219.848	2775	0	2775	269.828	809.485	3.77E+08	1442.372	4095	502	3593	486.563	1459.688
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	
2	158.666	158.045	100698.6	1269.324	317.952	316.71	41376979	158.46	2397	0	2397	194.009	582.027	57406766	219.848	2775	0	2775	269.828	809.485	3.77E+08	1442.372	4095	502	3593	486.563	1459.688


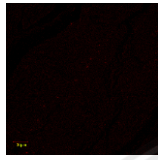

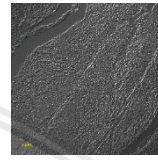
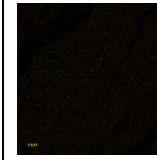
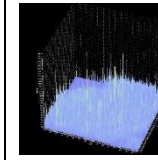
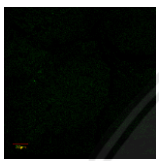


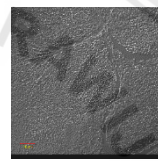

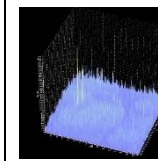
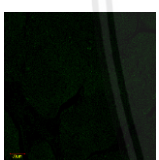
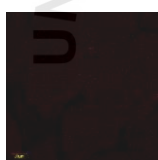
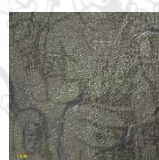
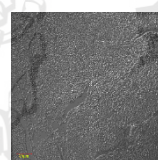

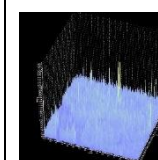
• S3B3 B

Region Measurement - S3B3 GONAD E2-FITC ER-TRITC 400X B.oib Z:0 T:0 L:0 ROI:2																											
	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
Count	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Average	158.665	158.665	100305.2	1266.84	316.71	316.71	57379036	220.604	2844	0	2844	232.655	697.965	67239605	258.514	3744	0	3744	290.737	872.21	3.71E+08	1428.067	4095	528	3567	505.578	1516.735
Max	158.665	158.665	100305.2	1266.84	316.71	316.71	57379036	220.604	2844	0	2844	232.655	697.965	67239605	258.514	3744	0	3744	290.737	872.21	3.71E+08	1428.067	4095	528	3567	505.578	1516.735
Min	158.665	158.665	100305.2	1266.84	316.71	316.71	57379036	220.604	2844	0	2844	232.655	697.965	67239605	258.514	3744	0	3744	290.737	872.21	3.71E+08	1428.067	4095	528	3567	505.578	1516.735
Range	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3StdDev	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI	CenterX	CenterY	Area	Perimeter	LengthL	LengthS	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev	Integratio	Average	Max	Min	Range	StdDev	3StdDev
	[um]	[um]	[um^2]	[um]	[um]	[um]	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH1	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	CH2	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1	TD1
2	158.665	158.665	100305.2	1266.84	316.71	316.71	57379036	220.604	2844	0	2844	232.655	697.965	67239605	258.514	3744	0	3744	290.737	872.21	3.71E+08	1428.067	4095	528	3567	505.578	1516.735



Lampiran 4. Gambar Intensitas Ekspresi Estrogen Reseptor

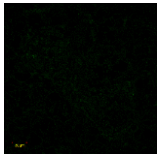
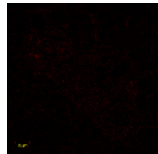

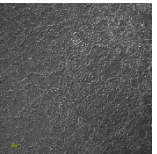
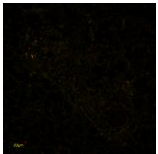
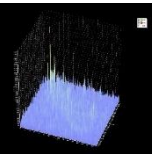
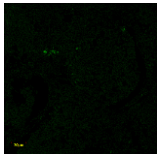
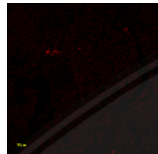

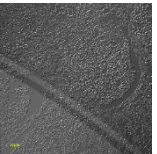
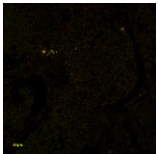
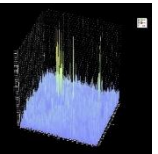
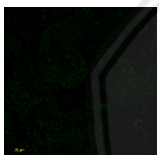


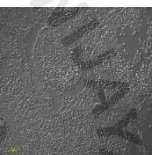

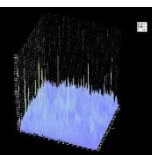
- Intensitas Ekspresi ER Pada Gonad Kerang Hijau Jantan
 - Perairan Kaligung Pasuruan

	E2 FITC	ER TRITC	<i>Super Impose (SI)</i>	<i>Differential Interference Contras (DIC)</i>	Gabungan E2 FITC dan ER TRITC	Grafik 3 dimensi
S1J1						
S1J2						
S1J3						

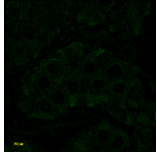
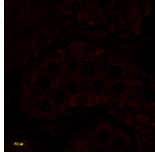

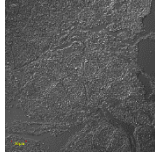
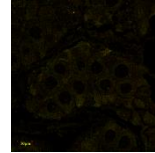
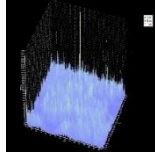
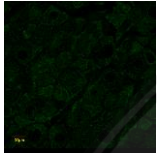
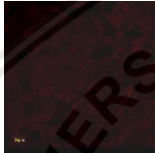

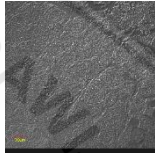
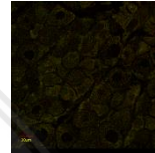
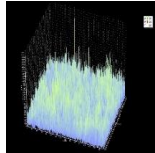
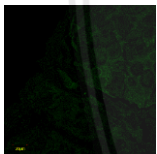

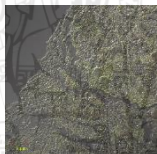
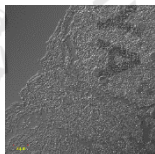
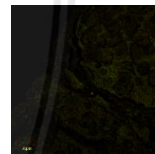
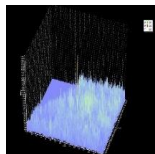
- Perairan Nguling Pasuruan

	E2 FITC	ER TRITC	<i>Super Impose (SI)</i>	<i>Differential Interference Contras (DIC)</i>	Gabungan E2 FITC dan ER TRITC	Grafik 3 dimensi
S2J1						
S2J2						
S2J3						

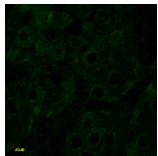
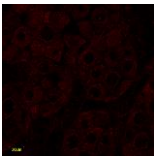
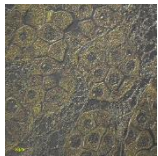
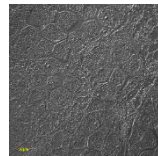
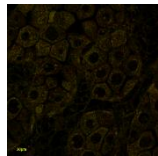
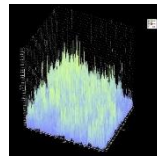
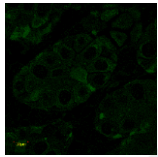
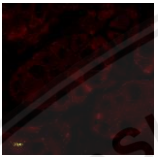

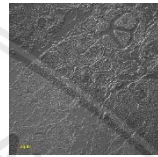
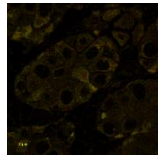
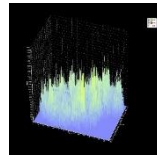
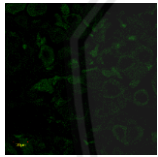
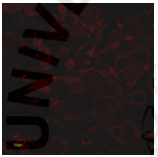
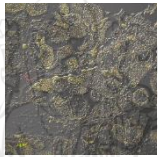
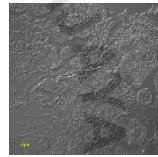
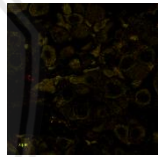
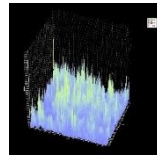
- Perairan Ngembah Gresik

	E2 FITC	ER TRITC	<i>Super Impose (SI)</i>	<i>Differential Interference Contras (DIC)</i>	Gabungan E2 FITC dan ER TRITC	Grafik 3 dimensi
S3J1						
S3J2						
S3J3						

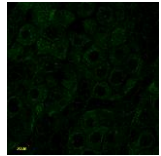
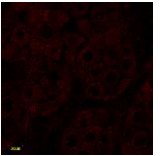
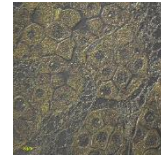
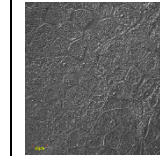
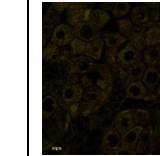
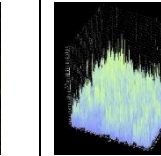
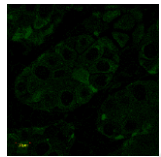
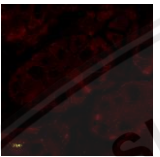

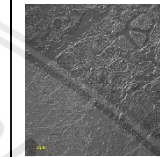
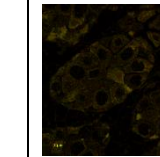
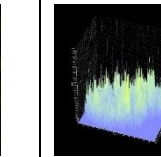
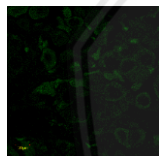


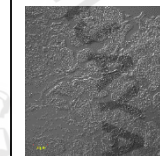
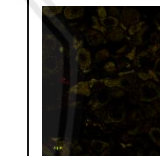
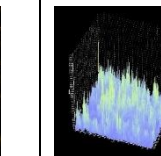
- Intensitas Ekspresi ER Pada Gonad Kerang Hijau Betina
 - Perairan Kaligung Pasuruan

	E2 FITC	ER TRITC	<i>Super Impose (SI)</i>	<i>Differential Interference Contras (DIC)</i>	Gabungan E2 FITC dan ER TRITC	Grafik 3 dimensi
S1B1						
S1B2						
S1B3						

- Perairan Nguling Pasuruan

	E2 FITC	ER TRITC	<i>Super Impose (SI)</i>	<i>Differential Interference Contras (DIC)</i>	Gabungan E2 FITC dan ER TRITC	Grafik 3 dimensi
S2B1						
S2B2						
S2B3						

- Perairan Ngembah Gresik

	E2 FITC	ER TRITC	<i>Super Impose (SI)</i>	<i>Differential Interference Contras (DIC)</i>	Gabungan E2 FITC dan ER TRITC	Grafik 3 dimensi
S2B1						
S2B2						
S2B3						

Lampiran 5. Data Hasil Analisa ANOVA One –Way menggunakan SPSS 16.0

A. Hasil Analisa ANOVA One –Way Pada Gonad Kerang Hijau (*Perna Viridis*) Jantan

Descriptives

Hasil

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kaligung	3	1.5298E2	32.30101	18.64900	72.7432	233.2235	121.94	186.41
Nguling	3	1.1112E2	26.80716	15.47712	44.5307	177.7160	80.52	130.45
Ngemboh	3	1.3614E2	23.56806	13.60702	77.5937	194.6863	118.27	162.85
Total	9	1.3342E2	30.20069	10.06690	110.2012	156.6299	80.52	186.41

Test of Homogeneity of Variances

Hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.096	2	6	.910

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2661.791	2	1330.896	1.723	.256
Within Groups	4634.865	6	772.477		
Total	7296.656	8			



B. Hasil Analisa ANOVA One –Way Pada Kerang Hijau (*Perna Viridis*) Betina

Descriptives

Hasil

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kaligung	3	2.2454E2	54.90333	31.69845	88.1559	360.9308	186.34	287.46
Nguling	3	2.7529E2	42.01831	24.25928	170.9141	379.6726	226.91	302.62
Ngemboh	3	2.7622E2	33.23792	19.18992	193.6558	358.7909	239.18	303.44
Total	9	2.5869E2	46.12022	15.37341	223.2355	294.1378	186.34	303.44

Test of Homogeneity of Variances

Hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.874	2	6	.465

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5247.250	2	2623.625	1.338	.331
Within Groups	11769.346	6	1961.558		
Total	17016.596	8			



Lampiran 6. Data Hasil Perhitungan ANOVA Seca Manual

A. Rata-Rata Intensitas Gonad Kerang Hijau (*perna viridis*) Jantan

Ulangan	Perlakuan			Total
	Kaligung	Nguling	Ngemboh	
1	186,41	80,52	118,27	
2	121,94	130,45	162,85	
3	150,60	122,40	127,30	
TOTAL	458,95	333,37	408,42	1200,74
RATA-RATA	152,98	111,12	136,14	

$$FK = \frac{\text{Kuadrat Dari Jumlah Keseluruhan Data}}{\text{Data yang ada}}$$

$$= (1200,74)^2 / 9 = 160197,39$$

$$JKT = \text{Jumlah Dari Tiap Data Dikuadratkan} - FK$$

$$= ((186,41)^2 + (121,94)^2 + (150,60)^2 + (80,52)^2 + (130,45)^2 + (122,40)^2 + (118,27)^2 + (162,85)^2 + (127,30)^2) - 160197,39$$

$$= 7296,66$$

$$JKP = ((458,95)^2 + (333,37)^2 + (408,42)^2) / 3 - 160197,39 = 2661,79$$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 7296,66 - 2661,79 = 4634,86$$

$$KTP = JKP / t-1 = 2661,79 / 3-1$$

$$= 1330,90$$

$$KTG = JKG / t(n-1) = 4634,86 / 3 (3-1) = 772,48$$

$$F. \text{ Hitung} = KTP / KTG = 1330,90 / 772,48 = 1,72$$

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	2661,79	1330,90	1,72	5,14	10,92
Galat	6	4634,86	772,48			
Total	8	7296,66				

F 0,05 : F. hitung < F. Tabel = 1,72 > 5,14 (tidak berbeda nyata)

F 0,01 : F. hitung < F. Tabel = 1,72 > 10,92 (tidak berbeda nyata)

B. Rata-Rata Intensitas Gonad Kerang Hijau (*perna viridis*) Betina

Ulangan	Perlakuan			Total
	Kaligung	Nguling	Ngemboh	
1	199,83	302,62	303,44	
2	287,46	296,35	286,05	
3	186,34	226,91	239,18	
TOTAL	673,63	825,88	828,67	2328,18
RATA-RATA	224,54	275,29	276,22	

$$FK = \frac{\text{Kuadrat Dari Jumlah Keseluruhan Data}}{\text{Data yang ada}}$$

$$= (2328,18)^2 / 9 = 602269,12$$

$$JKT = \text{Jumlah Dari Tiap Data Dikuadratkan} - FK$$

$$= ((199,83)^2 + (287,46)^2 + (186,34)^2 + (302,62)^2 + (296,35)^2 + (226,91)^2 + (303,44)^2 + (286,05)^2 + (239,18)^2) - 602269,12$$

$$= 17016,60$$

$$JKP = ((673,63)^2 + (825,88)^2 + (828,67)^2) / 3 - 602269,12 = 5247,25$$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 17016,60 - 5247,25 = 11769,35$$

$$KTP = JKP / t-1 = 5247,25 / 3-1$$

= 2623,62

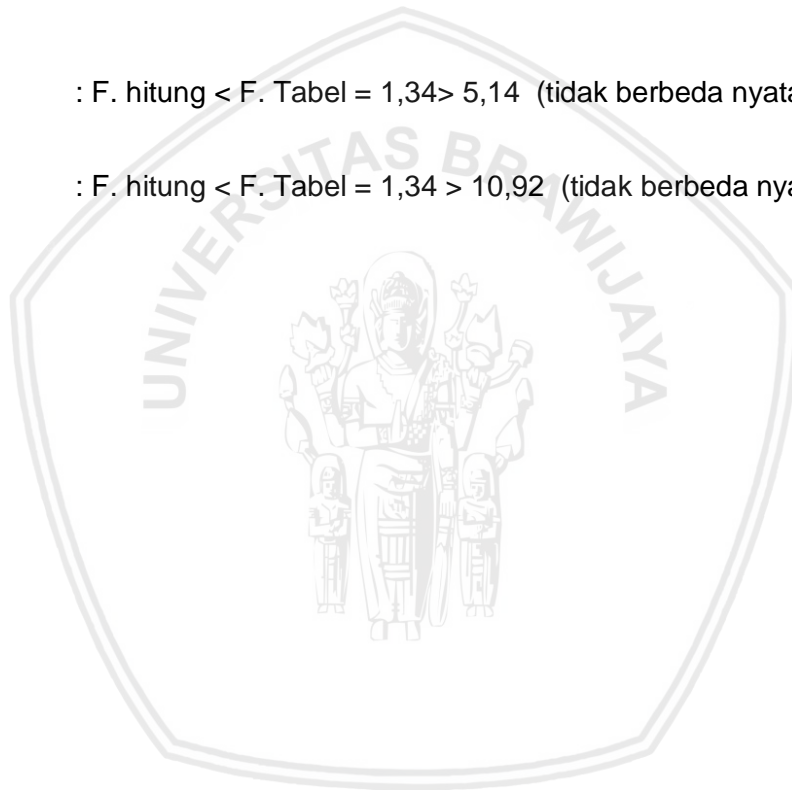
KTG = $JKG / t(n-1) = 11769,35 / 3 (3-1) = 1961,56$

F. Hitung = $KTP / KTG = 2623,62 / 1961,56 = 1,34$

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	5247,25	2623,62	1,34	5,14	10,92
Galat	6	11769,35	1961,56			
Total	8	17016,60				

F 0,05 : F. hitung < F. Tabel = 1,34 > 5,14 (tidak berbeda nyata)


F 0,01 : F. hitung < F. Tabel = 1,34 > 10,92 (tidak berbeda nyata)



Lampiran 7. Log Book Kegiatan Penelitian

No	Tanggal	Uraian Kegiatan	Dokumentasi Pribadi
1.	09-12-2018	Pengambilan kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) di Perairan Kaligung Pasuruan	
2.	09-12-2018	Pengambilan kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) di Perairan Nguling Pasuruan	
3.	09-12-2018	Pengambilan kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) di Perairan Ngemboh Gresik	
4.	09-12-2018	Pengukuran suhu dan DO meter menggunakan DO meter di tiga stasiun	



Lanjutan lampiran 7.

5.	09-12-2018	Pengukuran menggunakan refraktometer salinitas	
6.	09-12-2018	Pengukuran menggunakan pH meter di tiga stasiun pH	
7.	09-12-2018	Penangkapan kerang di kaligung	
8.	09-12-2018	Kerang ditaruh didalam cool box yang berisikan air laut dan diberi aerator	

Lanjutan lampiran 7.

9.	10-12-2018	Kerang dibedah dan dipilih antara jantan dan betina untuk diambil gonadnya	
10.	10-12-2018	Gonad dimasukkan ke dalam botol film dan diberi formalin 10% sesuai stasiun dan sesuai jenis kelamin untuk dipreparasi	
11	14-03-2019	Antibodi pesanan datang	
12	08-04-2019	Pewarnaan <i>double staining</i> dengan antibodi FITC dan TRITC ke sampel yang telah berbentuk preparat sebanyak 9 sampel dari 18 sampel	

Lanjutan lampiran 7.

13	09-04-2019	Pewarnaan <i>double staining</i> dengan antibodi FITC dan TRITC ke sampel yang telah berbentuk preparat sebanyak 9 sampel dari 18 sampel	
14	08-04-2019	Menganalisis kadar estrogen dan estrogen reseptor dengan menggunakan alat <i>Confocal Laser Scanning Microscoping</i>	
15	15-04-2019	Menganalisis data kadar estrogen dan estrogen reseptor dengan menggunakan software <i>Region Measurement</i> pada komputer	